

**Die Wirkung volatiler Anästhetika
auf die Permeabilität eines *in vitro* Modells
der Blut-Hirn-Schranke**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Jan Andreas Kleinstück
aus Köln

Gießen 2003

Aus dem Max-Planck-Institut
für Physiologische und Klinische Forschung
Kerkhoff-Institut
Abteilung Experimentelle Kardiologie
Leiter: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Schaper
In Bad Nauheim

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Schaper
Gutachter: PD Dr. T. Noll

Tag der Disputation: 22.4.2003

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I Einleitung	1
1 Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke	1
2 <i>In vitro</i> Modelle der Blut-Hirn-Schranke	4
3 Pathologie der Blut-Hirn-Schranke	5
4 Ziele dieser Arbeit	6
II Methoden	7
1 Apparatur: Kammersystem zur Inkubation der Zellen unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen in Gegenwart volatiler Anästhetika	7
2 Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung der Zellen	10
3 Zytotoxizitätstest, Vitalzählung und Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration	18
4 Permeabilitätsmessungen am <i>in vitro</i> Modell der Blut-Hirn-Schranke	20
5 Bestimmung der VEGF-Expression in mikrovaskulären Endothelzellen	24
6 Statistik	34
III Ergebnisse	35
1 Konstanz und Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen	35
2 Charakterisierung der Zellen	36
3 Wirkung der volatilen Anästhetika auf Vitalität, Morphologie und Gesamtproteinkonzentration mikrovaskulärer Endothelzellen und auf Vitalität von Astrozyten	46
4 Wirkung der volatilen Anästhetika auf die Permeabilität des <i>in vitro</i> Modells der Blut-Hirn-Schranke	52
5 Wirkung der volatilen Anästhetika auf die VEGF-Expression in mikrovaskulären Endothelzellen	55

IV	Diskussion	61
1	Konstanz und Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen	62
2	Charakterisierung der Zellen	62
3	Wirkung der volatilen Anästhetika auf Vitalität, Morphologie und Gesamtproteinkonzentration mikrovaskulärer Endothelzellen und auf Vitalität von Astrozyten	63
4	Wirkung der volatilen Anästhetika auf die Permeabilität des <i>in vitro</i> Modells der Blut-Hirn-Schranke	64
5	Wirkung der volatilen Anästhetika auf die VEGF-Expression in mikrovaskulären Endothelzellen	68
6	Schlussfolgerung	70
V	Literaturverzeichnis	71
VI	Anhang	83
1	Material	83
2	Abkürzungsverzeichnis	91
VII	Zusammenfassung	93
VIII	Danksagung	95
IX	Lebenslauf	97

I. Einleitung

1. Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke

Ende des 19. Jahrhunderts machte Paul Ehrlich die Entdeckung, dass sich intravenös verabreichte Farbstoffe in allen Geweben des Organismus rasch verteilen, dass sie jedoch nicht ins Gehirn eindringen¹. Lewandowski führte zur Beschreibung dieses Phänomens im Jahre 1900 den Begriff „Blut-Hirn-Schranke“ (BHS) ein². Seit dieser Zeit wurden viele Konzepte einer Barriere für bestimmte Substanzen zwischen Blut und Gehirn diskutiert³. Heute wird allgemein akzeptiert, dass die BHS hauptsächlich das Ergebnis spezieller Eigenschaften des cerebralen Kapillarendothels ist.

In einer elektronenmikroskopischen Darstellung der Gerhirnkapillaren (Abb. 1,2) zeigt sich, dass die Endothelzellen durch eine kräftige Basallamina gegen die Nerven- und Gliazellen abgegrenzt sind. In die Basallamina sind Perizyten eingebettet, die einen funktionellen Beitrag zur BHS leisten, indem sie aus dem Blut ins interstitielle Hirngewebe übergetretene Stoffe durch Phagozytose entfernen^{4,5}. Darüber hinaus wird diskutiert, ob sie durch ihre kontraktile Elemente den Blutfluss in der Kapillare regeln können und damit in ihrer Funktion den glatten Muskelzellen peripherer Gefäße ähneln^{6,7}. Außerdem scheinen Perizyten durch die Ausschüttung von transforming growth factor β die Endothelzellproliferation zu hemmen⁸. Astrozyten reichen mit ihren Endfüßchen bis an die Basallamina heran und bedecken diese streckenweise vollständig. Sie stehen funktionell in enger Wechselwirkung mit den Endothelzellen und induzieren durch die Sekretion bislang unbekannter Faktoren viele der spezifischen Eigenschaften der BHS⁹⁻¹⁶.

Die Funktion der BHS liegt in der Aufrechterhaltung der Homöostase des Gehirns durch die Kontrolle des Stoffaustauschs mit dem Blut; es wird beispielsweise im Interstitium des Hirngewebes ein Ionenmilieu geschaffen, das optimal an die Funktion der Nervenzellen angepasst ist. Außerdem wird das Gehirn vor vielen im Blutkreislauf zirkulierenden potentiellen Toxinen und pathogenen Mikroorganismen geschützt.

Diese Eigenschaften kommen hauptsächlich dadurch zustande, dass cerebrale Kapillaren nicht fenestriert sind sowie die Endothelzellen durch tight junctions fest miteinander verknüpft sind und nur einen minimalen transzellulären Transport durch Pinozytose aufweisen¹⁷⁻²¹. Dies unterscheidet sie von anderen Kapillaren im Organismus und verhindert die para- und transzelluläre Passage der meisten Stoffe aus dem Blut ins Gehirn (und umgekehrt)²²⁻²⁴.

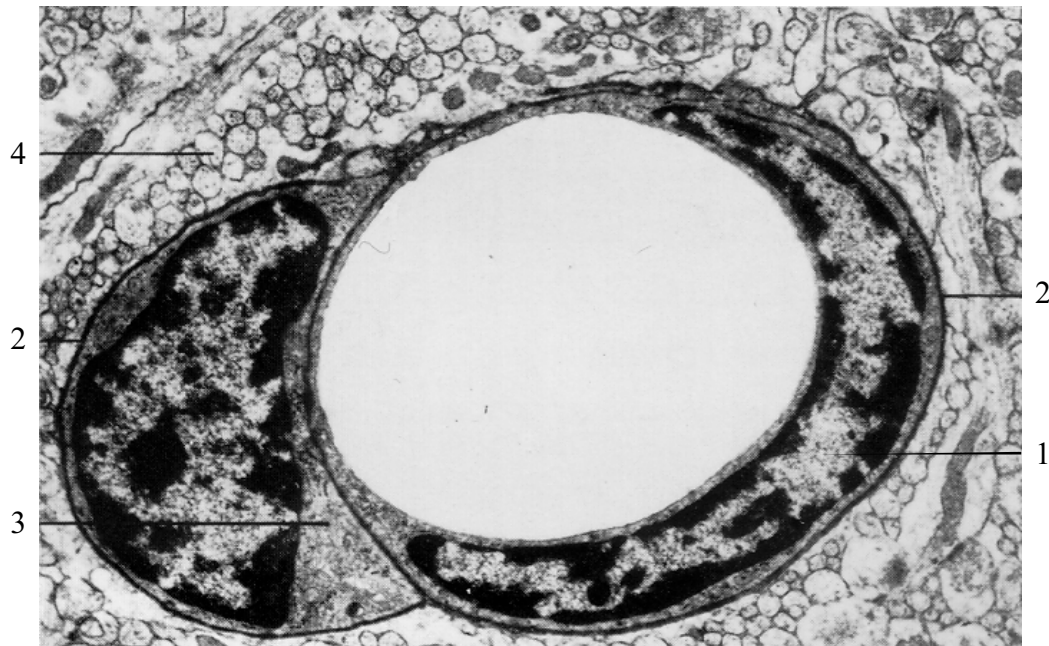


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Gehirnkapillare (Querschnitt). 1 Endothelzelle, 2 Basallamina, 3 Perizyt, 4 Nervenfasern. Vergrößerung 14 400fach. (aus²⁵)

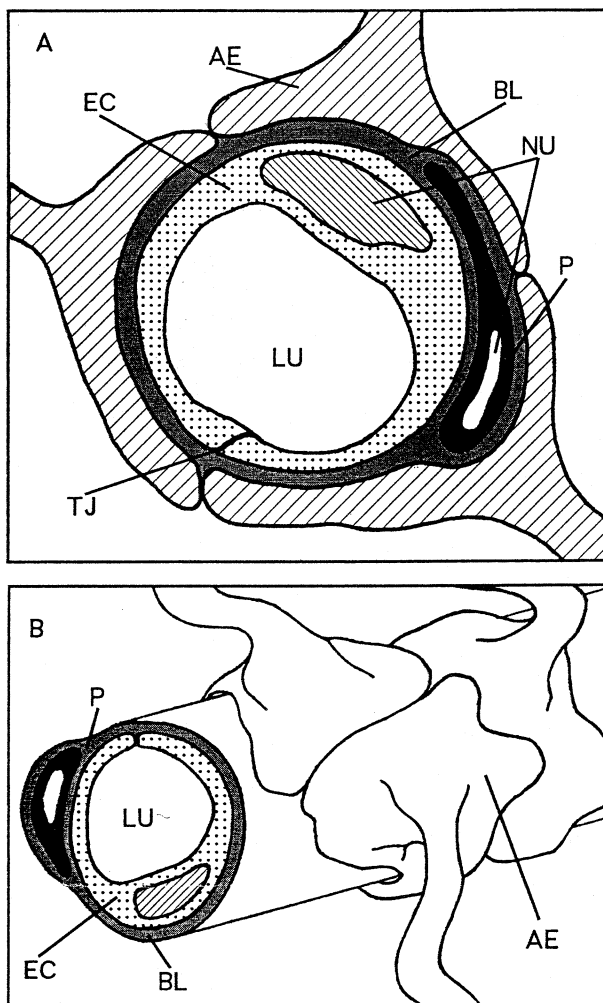


Abb. 2: Morphologie einer Gehirnkapillare

(A. Querschnitt, B. Aufsicht):

AE Astrozytenendfüßchen

BL Basallamina

EC Endothelzelle

LU Lumen der Kapillare

P Perizyt

TJ tight junction

NU Zellkern

(modifiziert nach Schlosshauer¹⁰)

Die BHS ist jedoch nicht nur eine physikalische Barriere. An der endothelialen Zellmembran lokalisierte Enzyme wirken zusätzlich als metabolische Barriere, indem sie viele Substanzen inaktivieren. Wichtige Enzyme des Gehirndothels sind die Alkalische Phosphatase, γ -Glutamyltransferase, DOPA-Decarboxylase, Monoaminoxidasen, Aminopeptidasen, Nucleotidasen^{26,27}.

Viele lipophile Substanzen wie Nikotin oder Diazepam können Zellmembranen allerdings problemlos überqueren und finden daher leicht Zugang zum Gehirn. Die Lipophilie ist jedoch kein Garant für die Passage über die BHS, denn in den Endothelzellen gelegenes P-Glycoprotein kann einige der Stoffe, die bereits vom Blut ins Zytoplasma der Endothelzellen eingedrungen sind, ins Gefäßlumen zurücktransportieren^{10,28}.

Freie Diffusion durch das Endothel ist für Sauerstoff, Kohlendioxid oder Wasser möglich. Da Glucose, Aminosäuren oder Ketonkörper jedoch nicht in der Lage sind, die BHS passiv zu überwinden, existieren eine Reihe von Transportmechanismen (Abb. 3), die die Versorgung des Gehirns mit diesen und anderen essentiellen Substanzen gewährleisten²⁹⁻³³.

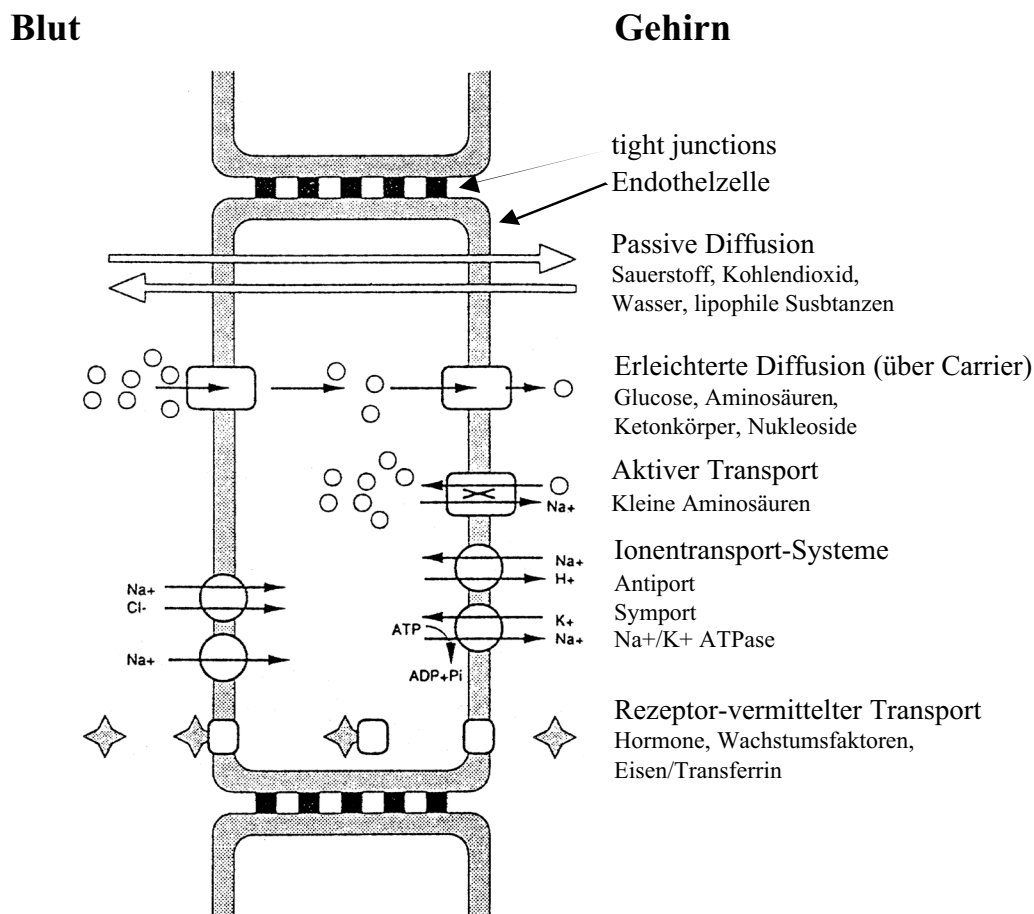


Abb. 3: Schematische Darstellung einiger Transportmechanismen des cerebralen Kapillarendothels (modifiziert nach Zinke³⁴).

2. *In vitro* Modelle der Blut-Hirn-Schranke

Zur Erforschung der BHS werden vielfach *in vivo* Tiermodelle eingesetzt. Da mit diesen jedoch Untersuchungen auf zellulärer und molekularer Ebene nur begrenzt möglich sind, wurden *in vitro* Modelle der BHS entwickelt: Aus Hirnkapillaren isolierte Endothelzellen werden kultiviert, bis sie konfluente Monolayer bilden, die dann viele der *in vivo* Charakteristika der BHS zeigen.

Zur Isolierung einer homogenen vitalen Population mikrovaskulärer Gehirnendothelzellen aus der sehr heterogenen Zellpopulation des Hirngewebes werden mechanische und enzymatische Auftrennungsverfahren, gefolgt von Filtrations- und Zentrifugationsschritten, eingesetzt. Es hat sich gezeigt, dass *in vitro* Modelle der BHS mit Primärzellkulturen den *in vivo* Gegebenheiten am ähnlichsten sind. Die Zellen weisen dann sowohl die typische Morphologie wie das ausschließlich einschichtige Wachstum, die Ausbildung von tight junctions und die nicht vorhandene Fenestrierung als auch die Ausprägung spezifischer Enzyme auf wie die Alkalische Phosphatase, γ -Glutamyltransferase und Monoaminoxidase³⁵⁻³⁸.

Dennoch gibt es einige Merkmale des *in vitro* Modells der BHS, die sich von der *in vivo* Situation unterscheiden. Die Ausdehnung und Komplexität der tight junctions zwischen mikrovaskulären Endothelzellen ist *in vitro* vermindert und führt so zu einer erhöhten parazellulären Permeabilität³⁹⁻⁴². Dies lässt sich durch Messungen des elektrischen Widerstandes über die Endothelzellen, der ein Maß für die Ausprägung der Interzellularverbindungen ist, belegen: *In vivo* Messungen an Froschgehirnendothelzellen ergaben Widerstandswerte um $1800 \Omega\text{cm}^2$ ⁴³, während Messungen an konfluenten Monolayern kultivierter mikrovaskulärer Gehirnendothelzellen nur Werte zwischen 60 und $300 \Omega\text{cm}^2$ lieferten^{41,44-46}. Außerdem weisen die Zellen *in vitro* einige metabolische Defizite auf. So fehlt beispielsweise die ATP-abhängige rezeptor-gesteuerte Exozytose, was vermutlich auf einer Schädigung der Zellen während der Isolierung beruht⁴⁷. Ein weiteres Problem stellt eine Kontaminierung der Endothelzellkultur durch andere Zellarten wie Perizyten oder Fibroblasten dar⁴⁸⁻⁵⁰.

Trotzdem stellt das *in vitro* System insgesamt eine gute Möglichkeit zur Erforschung der BHS dar, auch deshalb, weil es Untersuchungen unabhängig von Parametern der Hämodynamik zulässt, die die BHS *in vivo* beeinflussen.

Das in dieser Arbeit eingesetzte *in vitro* Modell zur Durchführung von Permeabilitätsstudien (Abb. 4) besteht aus mikrovaskulären Schweinegehirnendothelzellen, die auf kollagenbeschichteten Filtermembran-Inserts kultiviert werden, bis sie einen konfluenten Monolayer bilden. Nach Einsetzen des Filtermembran-Inserts in eine 24-Well-Platte kann nun eine apikale Kammer (oberhalb der Endothelzellen) von

einer basolateralen Kammer (unterhalb der Filtermembran) unterschieden werden. Beide Kammern stehen untereinander nur über die Filtermembran mit dem Zellmonolayer in Verbindung. Die Permeabilität kann nun gemessen werden, indem die Passage eines geeigneten Markers, der *in vivo* die BHS nur geringfügig passiert, von der apikalen Kammer über den Endothelzellmonolayer in die basolaterale Kammer bestimmt wird.

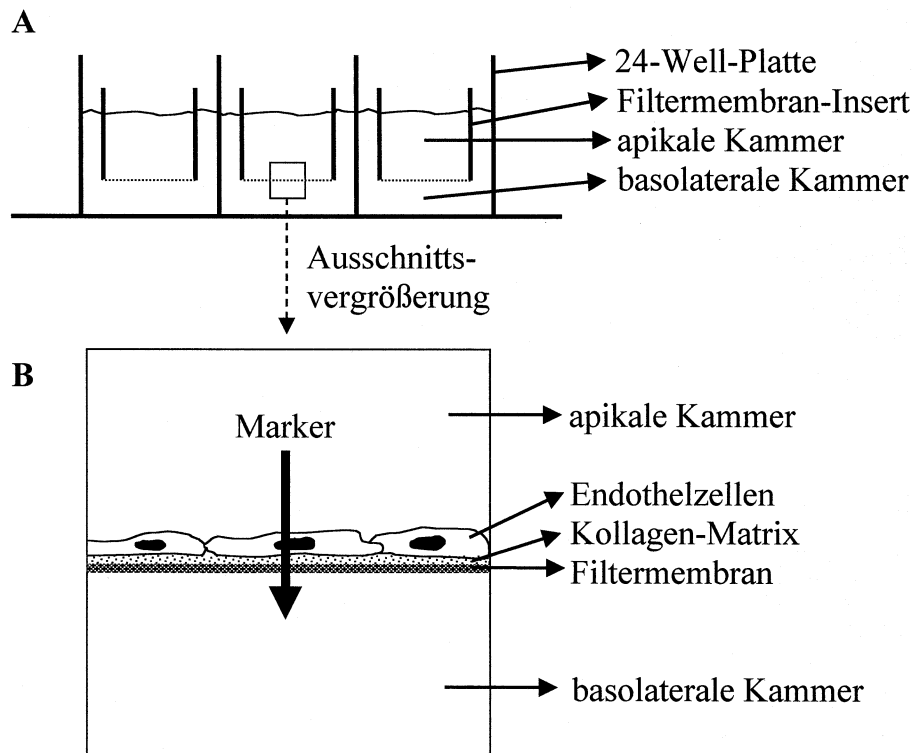


Abb. 4: Schematische Darstellung des *in vitro* Modells der Blut-Hirn-Schranke. (**B** stellt eine Ausschnittsvergrößerung von **A** dar.)

3. Pathologie der Blut-Hirn-Schranke

Cerebrale pathologische Bedingungen wie Hypoxie, Entzündung oder Tumor können zur Dysfunktion des mikrovaskulären Gehirndothels führen⁵¹⁻⁵⁷. Durch Aufgehen der tight junctions mit Spaltbildung zwischen den Endothelzellen, Fenestrierung der vorher unfenestrierten Kapillaren und Steigerung transzytotischer Aktivität kommt es zum Zusammenbruch der BHS⁵⁸. Dies resultiert in einer stark erhöhten Permeabilität der Hirnkapillaren und führt durch Austritt von Wasser, Elektrolyten und Plasmaproteinen aus den Blutgefäßen in den Interzellularraum zu einem vasogenen Hirnödem, das das Hirngewebe zusätzlich schädigt^{44,53,54,59-66}.

Es ist bekannt, dass unter hypoxischen Bedingungen in Endothelzellen die Expression von vascular endothelial growth factor (VEGF) induziert wird, der auch als vascular permeability factor bezeichnet wird^{65,67-70}. VEGF ist ein Glykoprotein, von dem

mindestens vier verschiedene Isoformen existieren. Diese Isoformen bestehen aus 121, 165, 189 oder 206 Aminosäuren und kommen durch alternatives Splicing der mRNA zustande. VEGF zeigt eine hohe Spezifität für Endothelzellen^{61,71}. Seine Wirkungen sind unter anderem die Stimulation der Angiogenese und Erhöhung der kapillären Gefäßpermeabilität^{61,72-78}. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität eines *in vitro* Modells der BHS, das aus konfluenten Kulturen mikrovaskulärer Endothelzellen aus Schweinegehirnen bestand, durch autokrine VEGF-Expression hervorgerufen wurde⁷⁹.

Die als intravenöse Anästhetika eingesetzten Barbiturate Thiopental und Methohexital sind dafür bekannt, *in vivo* unter hypoxischen Bedingungen eine neuroprotektive Wirkung auszuüben, da sie durch Reduktion des cerebralen Blutflusses die Ausprägung eines vasogenen Ödems vermindern, den Sauerstoffmetabolismus des Gehirns insgesamt verringern und Hypothermie erzeugen^{55,80-84}. Bislang war unbekannt, ob dieser neuroprotektive Effekt auch durch eine direkte Beeinflussung der BHS durch die Barbiturate zustande kommt. Fischer et al. konnten dies nun nachweisen, indem sie an der *in vitro* BHS zeigten, dass Thiopental und Methohexital die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität dosisabhängig reduzierten und dass diese Wirkung durch die Verminderung der VEGF-Expression in den Endothelzellen zustande kam⁸⁵⁻⁸⁷. Es wird daher vermutet, dass der neuroprotektive Effekt der Barbiturate auch auf die Reduktion des unter Hypoxie auftretenden Anstiegs der vaskulären Permeabilität zurückzuführen ist.

4. Ziele dieser Arbeit

Volatile Anästhetika werden im klinischen Bereich häufig zur Durchführung der Allgemeinanästhesie (Vollnarkose) bei operativen Eingriffen eingesetzt. Bislang ist nur wenig über die Wirkung dieser Pharmaka auf Funktionen der BHS bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss der volatilen Anästhetika Halothan, Enfluran, Isofluran, Sevofluran und Desfluran auf die Permeabilität eines *in vitro* Modells der BHS zu untersuchen. Die Erkenntnisse über die Reduktion der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität der BHS durch die intravenösen Anästhetika Thiopental und Methohexital führten zu der Überlegung, auch die Wirkung volatiler Anästhetika unter *hypoxischen* Bedingungen auf die *in vitro* BHS zu untersuchen.

Da nachweislich die Permeabilitätserhöhung des Endothelzellmonolayers unter Hypoxie über autokrine VEGF-Ausschüttung induziert wird, sollte weiterhin die VEGF-Expression in mikrovaskulären Endothelzellen in Gegenwart der volatilen Anästhetika unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen untersucht werden.

II. Methoden

Genauere Angaben zum eingesetzten Material (hier gekennzeichnet durch M1, M2, M3 etc.) und seiner Bezugsquelle finden sich im Anhang.

1. Apparatur: Kammersystem zur Inkubation der Zellen unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen in Gegenwart volatiler Anästhetika

Ein spezielles Kammersystem (Abb. 5) ermöglichte die Inkubation der Zellen unter normoxischen (21 Vol.-% Sauerstoff) oder hypoxischen (2 Vol.-% Sauerstoff) Bedingungen in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika. Dabei wurde die Innentemperatur der Kammer mit 37°C ebenso wie die hohe Luftfeuchtigkeit (80-90%) und die 5 Vol.-% Kohlendioxidgehalt konstant gehalten.

1.1. Aufbau des Kammersystems

Das Kammersystem (Eigenbau) bestand aus einem nach oben offenen Edelstahlzylinder (Innenmaße: 180 mm Durchmesser, 215 mm Höhe, 5 mm Wandstärke), der durch einen aufgesetzten Plexiglasdeckel gasdicht verschlossen werden konnte. Die Einbettung des Edelstahlzylinders in Styropor diente der Wärmeisolierung.

Ein Thermostat regelte über Leistungstransistoren elektronisch die Innentemperatur des Zylinders, die kontinuierlich 37°C betrug, ein Ventilator sorgte für die ständige Umwälzung der Gase. Die hohe Luftfeuchtigkeit wurde dadurch erreicht, dass der Boden der Kammer mit Wasser benetzt war.

Zur Kontrolle wurden Temperatur und Luftfeuchtigkeit im Inneren der Kammer über Messfühler ermittelt und auf eine Anzeigetafel übertragen.

Zwei durch Ventile verschließbare Metallröhrchen, die in den Plexiglasdeckel eingelassen waren, sorgten für die Gaszufuhr und -abfuhr. An der Gaszufuhrseite waren über ein T-förmiges Verbindungsstück die Zuleitung des Gasgemisches aus Sauerstoff, Kohlendioxid und Stickstoff (bereits vorgemischt in einer Druckgasflasche bezogen) mit der Zuleitung des flüssigen Anästhetikums aus einem Perfusor verbunden.

Die Gasabfuhr aus der Kammer teilte sich über ein T-förmiges Verbindungsstück in eine Ableitung zur Analyse des Gasgemisches im Gasmonitor und eine weitere Ableitung zur Gasentsorgung.

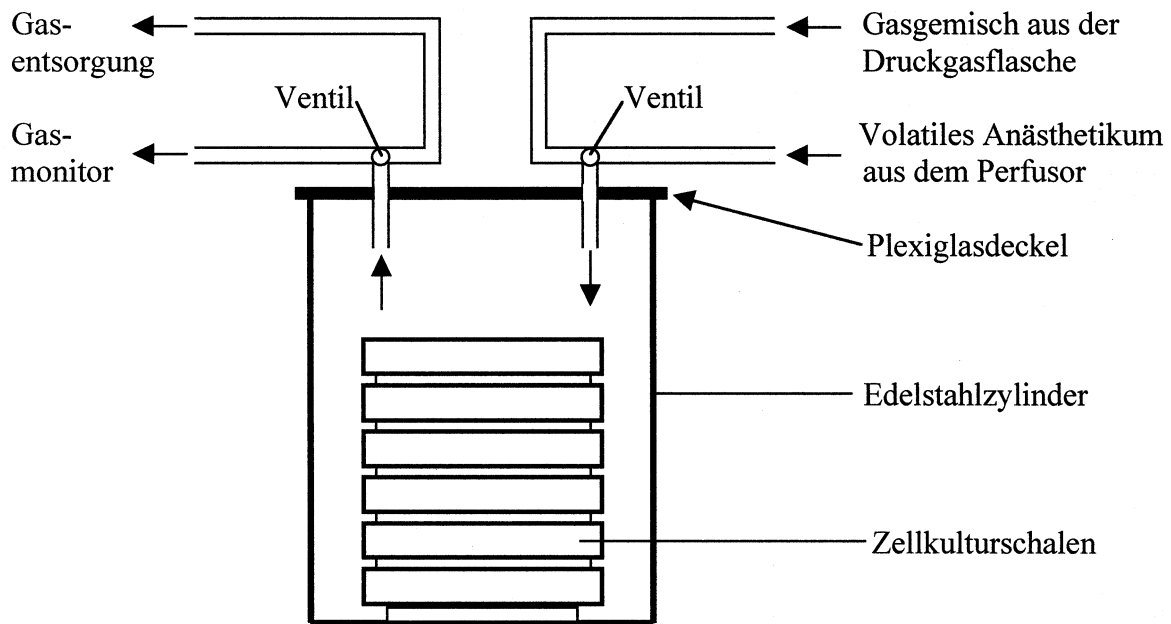


Abb. 5: Schematische Darstellung des Kammersystems.

1.2. Versuchsdurchführung

Der Boden der auf 37°C vorgeheizten Kammer wurde mit einigen ml Wasser benetzt, um während des Versuchs die erforderlichlich hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten.

Die Zellkulturschalen wurden vorsichtig auf einen Metallrost auf dem Boden gestellt. Nun wurde die Kammer mit dem Plexiglasdeckel fest verschlossen. Die Gaszu- und Gasabfuhrventile wurden geöffnet und die Schlauchverbindungen zwischen Kammer und Druckgasflasche, Perfusor, Gasmonitor und Abgasleitung hergestellt. Der Gasmonitor wurde eingeschaltet und zeigte nun die Konzentrationen von Sauerstoff, Kohlendioxid und Narkosegas in der Kammer an. Das flüssig vorliegende Anästhetikum wurde in eine 50 ml-Perfusorspritze gefüllt und diese in den Perfusor eingesetzt, dieser jedoch noch nicht gestartet.

Nun wurde die Druckgasflasche geöffnet und das Gasgemisch (M1) aus Sauerstoff, Kohlendioxid und Stickstoff mit ca. 3000 ml/min in die Kammer eingeleitet, um so die Luft rasch zu verdrängen. Der vollständige Gasaustausch dauerte ca. 3 min und ließ sich auf dem Gasmonitor verfolgen. Waren in der Kammer die gewünschten Konzentrationen an Sauerstoff und Kohlendioxid erreicht, wurde die Zufuhr auf ca. 100 ml/min gedrosselt und der Perfusor gestartet. Zuerst wurde ein Bolus (1-4 ml) des Anästhetikums in die Kammer gegeben, um die Konzentration rasch ansteigen zu lassen. Aufgrund ihres hohen Dampfdruckes verdampften die volatilen Anästhetika in der auf 37°C erwärmten Kammer innerhalb weniger Sekunden; daher ließ sich auf dem Gasmonitor bald ein Anstieg der Narkosegaskonzentration beobachten. Die

erwünschte Konzentration wurde durch die Bolusgabe fast erreicht. Auf dem Perfusor wurde nun die kontinuierliche Abgabe von einigen ml/min eingestellt und so lange variiert, bis die Sollwerte der Gaskonzentrationen in der Kammer stabil waren. Dann wurden die Gaszu- und Gasabfuhrventile geschlossen. In der gasdicht verschlossenen Kammer waren die Zellen nun für die Versuchsdauer unter den eingestellten Bedingungen inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Gaskonzentrationen von Sauerstoff, Kohlendioxid und Narkosegas gemessen und eventuelle Unterschiede zum Ausgangswert dokumentiert. Die Zellkulturschalen konnten nun entnommen und weiter bearbeitet werden.

1.3. Volatile Anästhetika

In den Versuchen wurden folgende volatile Anästhetika eingesetzt: Halothan (M2), Enfluran (M3), Isofluran (M4), Sevofluran (M5), Desfluran (M6). Es handelt sich um Standardpharmaka zur Durchführung von Inhalationsnarkosen, wie sie bei operativen Eingriffen eingesetzt werden, um beim Patienten den Zustand von Bewusstlosigkeit und Schmerzfreiheit hervorzurufen.

Zum Vergleich der Wirksamkeit der volatilen Anästhetika dient der MAC_{50} -Wert. MAC steht für „minimale alveoläre Konzentration“ und der MAC_{50} -Wert ist definiert als die Volumenkonzentration eines Narkosegases in den Alveolen der Lunge, ab der 50% der untersuchten Probanden keine Abwehrbewegung mehr auf einen definierten Schmerzreiz (Hautschnitt) zeigen.

Erniedrigt wird der MAC_{50} -Wert durch den gleichzeitigen Einsatz anderer bei der Durchführung von Narkosen gebräuchlicher Pharmaka wie Opioide, Lachgas, Sedativa, Hypnotika. Außerdem wird er durch Faktoren wie Hypothermie, Hypotension, Hypoxie oder Anämie modifiziert. Schließlich ist er noch vom Lebensalter abhängig.

Die in den Versuchen eingesetzten Volumenkonzentrationen der Anästhetika richteten sich nach MAC_{50} -Werten für Erwachsene mittleren Lebensalters (Tab. 1).

In den Versuchen wurden jeweils 4 MAC des Narkosegases eingesetzt, das heißt die vierfache Konzentration des MAC_{50} -Wertes. Für Versuche unter normoxischen Bedingungen mit Halothan bedeutete dies beispielsweise, dass die Zellen unter einer Atmosphäre inkubiert wurden, die 21 Vol.-% Sauerstoff, 5 Vol.-% Kohlendioxid und 3 Vol.-% Halothan enthielt.

Tabelle 1: MAC₅₀-Werte der Anästhetika

Anästhetikum	MAC₅₀-Wert [Vol.-%]	4 MAC [Vol.-%]
Halothan	0,75	3,0
Enfluran	1,68	6,7
Isofluran	1,28	5,1
Sevofluran	2,05	8,2
Desfluran	6,0	24,0

2. Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung der Zellen

In den Versuchen wurden mikrovaskuläre Gehirndothelzellen vom Schwein (=Brain microvascular endothelial cells, BMEC) und Astrozyten neonataler Ratten eingesetzt.

Sämtliche Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.1. Mikrovaskuläre Gehirndothelzellen vom Schwein

2.1.1. Zellisolierung

Die Zellisolierung erfolgte in Anlehnung an die von Mischek beschriebene Methode ⁸⁸.

Etwa 10 Gehirne von wenige Stunden zuvor geschlachteten Schweinen wurden für den Transport vom Schlachthof zum Labor in 70%igem Isopropanol auf Eis aufbewahrt. Im Labor wurden die Gehirne in ein 1 l-Becherglas überführt, das 200 ml auf 37°C vorgewärmte Earle Salz-Lösung (M7) enthielt.

Entfernen von Kleinhirn, Hirnstamm, Hirnhäuten und mechanische Zerkleinerung

Nach kurzem Abflammen der Hirne wurden Kleinhirn und Hirnstamm entfernt. Danach erfolgte die sorgfältige Abpräparation der Hirnhäute. Anschließend wurden die Gehirne mit Skalpellen bis zu einer breiartigen Konsistenz zerkleinert.

Enzymatischer Abbau

Die zerkleinerten Gehirne, die zusammen einem Volumen von etwa 500 ml entsprachen, wurden in ein Becherglas gegeben, das 200 ml auf 37°C vorgewärmtes BMEC-Medium ohne FCS (M8) enthielt. Unter stetigem Rühren wurde in Abständen insgesamt 45 ml Dispase-Lösung (M9) hinzugegeben. Die Suspension wurde bis zum

Eintritt der Homogenisierung etwa 2 h bei 30°C gerührt.

Gradient: Dextran

In 6 Zentrifugierröhrchen wurden jeweils 100 ml des Homogenisates mit 150 ml 15%iger Dextran-Lösung (M10) versetzt und durch Schütteln durchmischt. Die Suspension wurde bei 3600 g abzentrifugiert (10 min, bei 4°C). Der hauptsächlich aus Fett und Dextran bestehende Überstand wurde verworfen und die Pellets in je 8 ml BMEC-Medium ohne FCS (M8) aufgenommen und zusammengeführt.

Filtration

Die Zellsuspension wurde durch ein Siebgewebe aus Polyester (250 µm Porengröße) (M11) filtriert.

Inkubation und weitere enzymatische Verdauung

Dem Filtrat wurden 70 mg Kollagenase/Dispase (M12) (in 3 ml BMEC-Medium ohne FCS aufgenommen) zugesetzt. Die Suspension wurde anschließend für 4 h bei 37°C im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert.

Zentrifugation und Beurteilung der Zelldichte

Die Zellsuspension wurde auf sechs 15 ml-Falconröhrchen (M15) verteilt und 10 min bei 700 g abzentrifugiert. Der entstehende Überstand sowie die Fettschicht wurden verworfen und die Pellets in 30 ml BMEC-Medium (M13) in einem 50 ml-Falconröhrchen zusammengeführt. Wieder wurde zentrifugiert (10 min, 700 g), der Überstand verworfen und das Pellet in 30 ml BMEC-Medium resuspendiert.

250 µl der Suspension wurden in einer Petrischale mit 10 ml BMEC-Medium verdünnt und zum Abschätzen der Zelldichte mikroskopisch beurteilt (Erfahrungswert). Die Petrischale wurde dann in den Brutschrank überführt, um in den darauffolgenden Tagen das Zellwachstum zu verfolgen und eine eventuelle Kontaminierung der Primärzellen durch Bakterien zu erkennen.

Einfrieren

Nach einem letzten Zentrifugationsschritt der Suspension (10 min, 700 g) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in reinem FCS (M14) aufgenommen. Anschließend wurde die Suspension mit der gleichen Menge eines Gemisches aus 80% BMEC-Medium ohne FCS und 20% DMSO tropfenweise überschichtet und sofort in Cryoröhrchen (M16) transferiert. Diese wurden durch langsames Abkühlen bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.1.2. Eingesetzte Methoden zur Kultivierung der Zellen

Die mikrovaskulären Gehirndothelzellen wurden im Brutschrank bei 37°C in feuchter Atmosphäre unter 21 Vol.-% Sauerstoff und 5 Vol.-% Kohlendioxid kultiviert. Um eine gute Entwicklung der Zellen zu gewährleisten, wurde das Medium, in Abhängigkeit von der Zelldichte auf der Kulturschale, alle 2 bis 3 Tage gewechselt. In den Versuchen wurden nur *Primärkulturen* mikrovaskulärer Endothelzellen eingesetzt.

Kulturmedien

Kulturmedium für mikrovaskuläre Endothelzellen, die auf Petrischalen (M23), Objektträgern (M70) und 96-Well-Mikrotiterplatten (M71) kultiviert wurden:

BMEC-Medium (M13)

Kulturmedium für mikrovaskuläre Endothelzellen, die auf Filtermembranen (M29) kultiviert wurden:

Endothelial Cell Growth Medium MV (M21)

Beschichtung der Zellkulturschalen

Für die Kultur von mikrovaskulären Endothelzellen ist es notwendig, die Kulturschalen vor dem Aussäen der Zellen mit Kollagen zu beschichten, damit diese sich anheften können.

Die Kulturschalen wurden am Tag vor dem Aussäen der Zellen folgendermaßen beschichtet:

Filtermembranen wurden mit je 50 µl einer Lösung aus Kollagen Typ 1 (M22) und Essigsäure der Konzentration 0,02 mol/l (Verhältnis 1:1) beschichtet.

96-Well-Mikrotiterplatten und Objektträger wurden je Well mit 30 µl einer Lösung aus Kollagen Typ 1 (M22) und Essigsäure der Konzentration 0,02 mol/l (Verhältnis 1:50) beschichtet.

Nach dem Eintrocknen über Nacht standen sie für das Aussäen der Endothelzellen zur Verfügung.

Für Versuche mit Petrischalen wurden solche erworben, die bereits mit Kollagen Typ 1 beschichtet waren (M23).

Auftauen und Aussäen der Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde die benötigte Anzahl von Cryoröhrchen im Wasserbad auf 37°C erwärmt und anschließend ihr Inhalt in 10 ml Zellkulturmedium zusammengeführt. Die Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur 4 min bei 150 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert. Diese Reinigungsoperation wurde wiederholt. Nun konnten die Zellen auf die Zellkulturschalen ausgesät werden.

Am darauffolgenden Tag wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS (M25) gewaschen und neues Medium zugesetzt.

2.1.3. Charakterisierung der Zellen

Zur Prüfung der verwendeten Endothelzellkulturen auf Reinheit wurden verschiedene Methoden eingesetzt. Dabei war es das Ziel, das Vorliegen von Endothelzellen zu bestätigen und eventuelle Verunreinigungen durch Perizyten, glatte Muskelzellen, Fibroblasten oder Astrozyten auszuschließen.

Zusätzlich zu morphologischen Unterscheidungsmerkmalen, d.h. dem charakteristischen Aussehen einer mikrovaskulären Endothelzellkultur, wurden immunhistochemische Methoden eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten der Nachweis der Aufnahme von low density lipoprotein (LDL) und das Exprimieren des von-Willebrand-Faktors durch Endothelzellen. Der Nachweis des Fehlens der Proteine α -smooth-muscle-actin und glial-fibrillary-acidic-protein (GFAP), die von Endothelzellen nicht exprimiert werden, fand als Negativkontrolle Verwendung.

Nachdem Objektträger (M70) am Vortag mit Kollagen vorbeschichtet worden waren, wurden die Zellen nun ausgesät. Bis sich ein konfluent Monolayer gebildet hatte, wurde in regelmäßigen Abständen ein Mediumwechsel durchgeführt.

LDL Aufnahme

Fluoreszenzmarkiertes LDL (mit 1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbo-cyanin Perchlorat markiertes LDL) (M24) wurde in einer Endkonzentration von 10 μ g LDL/ml Medium den Endothelzellen zugesetzt. Die Objektträger wurden daraufhin 4 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und 2 min in 4%igem Paraformaldehyd in PBS fixiert.

Nach Waschen mit PBS wurde eine Zellkernfärbung mit 4,6-Diamino-2-phenylindol (DAPI) durchgeführt, das in einer Konzentration von 100 nmol/l in PBS vorlag. Schließlich wurde 20 min später die DAPI-Lösung durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Objektträger wurden mit Mowiol eingedeckelt.

von-Willebrand-Faktor / α -smooth-muscle-actin

Nach Abziehen des Mediums und Waschen der Objektträger mit PBS wurden die Zellen 3 min in -20°C kaltem Methanol (M26) fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde der erste Antikörper auf die Zellen gegeben. Für den Nachweis des von-Willebrand-Faktors wurde hierzu anti-human-von-Willebrand-factor (vom Kaninchen) in einer Verdünnung 1:80 in PBS verwendet. Zum Nachweis von α -smooth-muscle-actin diente monoclonal anti- α -smooth-muscle-actin (von der Maus) in einer Verdünnung 1:200 in PBS. Die Objektträger wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

An eine weitere Waschstufe (dreimal 5 min mit PBS) schloss sich die einstündige Inkubation mit dem zweiten Antikörper bei Raumtemperatur an. Hierbei fand biotin-conjugated-affinity-purified-donkey-anti-rabbit-IgG in einer Verdünnung 1:160 in PBS Verwendung (für den Nachweis des von-Willebrand-Faktors) bzw. biotin-conjugated-affinity-purified-anti-mouse-IgG in einer Verdünnung 1:200 in PBS (für den α -smooth-muscle-actin Nachweis).

Nach erneutem Waschen (dreimal 5 min mit PBS) wurde den Objektträgern bei beiden Nachweisreaktionen fluoreszenzmarkiertes Streptavidin (Cy²-conjugated-streptavidin; Verdünnung 1:100 in PBS) zugesetzt und wieder 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Wieder wurden die Objektträger gewaschen (dreimal 5 min mit PBS). Anschließend folgte ein Kernfärbungsschritt mit Propidiumjodid der Konzentration 500 nmol/l. Hierbei wurde Propidiumjodid nur 10 s auf dem Objektträger belassen und dann sofort wieder abgewaschen (zweimal 5 min mit PBS). Schließlich wurden die Objektträger mit Mowiol eingedeckelt.

Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Zur fotografischen Dokumentation wurde eine Digitalkamera eingesetzt.

Durch Kontrollen wurde sichergestellt, dass eine Kreuzreaktion des zweiten Antikörpers oder des fluoreszenzmarkierten Streptavidins mit den Zellen nicht stattgefunden hatte. Hierbei wurden die Zellen, wie oben beschrieben, behandelt mit der Änderung, dass der erste Antikörper nicht zugesetzt wurde. So konnte sichergestellt werden, dass der Fluoreszenznachweis wirklich auf der Reaktion des ersten Antikörpers beruhte.

Glial-fibrillary-acidic-protein (GFAP)

Der Nachweis von GFAP wurde analog zum Nachweis des von-Willebrand-Faktors durchgeführt. Nur wurde hier als erster Antikörper anti-cow-glial-fibrillary-acidic-protein (vom Kaninchen) (M27) verwendet. Alle folgenden Schritte waren exakt

gleich.

Ebenfalls wurde, wie oben beschrieben, kontrolliert, dass Kreuzreaktionen des zweiten Antikörpers oder des Cy²-conjugated-streptavidin mit den Zellen nicht stattfanden.

2.2. Astrozyten neonataler Ratten

2.2.1. Zellisolierung

Die Zellisolierung erfolgte nach der von Dehouck beschriebenen Methode.⁴⁰

(Lösungen für die Astrozytenisolierung: M17)

Entfernen der Hirnhäute und mechanische Zerkleinerung

Nach dem Töten von 10 etwa zwei Tage alten Ratten durch Enthauptung wurde der Schädel längs eröffnet und das Gehirn entnommen. Die Gehirne wurden in eine auf Eis lagernde Petrischale gegeben, die 5 ml der Lösung 1 enthielt.

Unter Sicht eines Stereomikroskops wurden die Hirnhäute entfernt und anschließend die Gehirne in Stückchen mit ca. 0,5 mm Durchmesser geschnitten. Das Gewebe wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt, das 10 ml der Lösung 1 enthielt, und 1 min bei 150 g abzentrifugiert.

Enzymatischer Abbau

Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml der Lösung 2 aufgenommen. Nun wurde das Falcon-Röhrchen 15 min bei 37°C im Wasserbad leicht geschüttelt. Nach Zugabe von 10 ml der Lösung 4 wurde die Suspension 3 min bei 150 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 2 ml der Lösung 3 aufgenommen und etwa 25 mal mit einer Pasteurpipette suspendiert. Im Anschluss wurde die Suspension 20 min ruhen gelassen. Der Überstand, der sich gebildet hatte, wurde in ein weiteres Falcon-Röhrchen transferiert; dazu wurden 3 ml der Lösung 5 gegeben. Das zurückbleibende Sediment wurde wieder mit 2 ml der Lösung 3 versetzt, 25 mal suspendiert und 20 min ruhen gelassen. Der sich bildende Überstand wurde zum ersten Überstand gegeben, das Sediment wurde verworfen.

Waschschritte und Entfernung von Mikroglia und Makrophagen

Die gesammelten Überstände wurden 10 min bei 150 g und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml

BME-Medium (M18) aufgenommen. Die Suspension wurde für 20 min bei Raumtemperatur in eine unbeschichtete Kulturflasche gegeben, um Mikroglia und Makrophagen durch Adhäsion zu entfernen. Die Lösung wurde daraufhin abgezogen und erneut abzentrifugiert (5 min, 150 g, Raumtemperatur); der Überstand wurde verworfen.

Kultivierung der Astrozyten zur Zellvermehrung

Das Pellet wurde in Astrozytenmedium (M20) aufgenommen und in eine mit Poly-L-Lysin-Hydrobromid (s. Kapitel II.2.2.2.) vorbeschichtete Kulturflasche (M68) gegeben. Die Zellen wurden bis zur Passage 2 kultiviert (s. Kapitel II.2.2.2.) und anschließend wie folgt eingefroren.

Einfrieren

Nach Entfernen des Mediums wurde in die Zellkulturflaschen jeweils 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (M19) gegeben. Die Lösung wurde durch Schwenken der Flaschen gleichmäßig verteilt und dann mit der Pipette wieder entfernt. Nach Wiederholen des Vorgangs wurde unter dem Mikroskop das Ablösen der Zellen von den Kulturflaschen beobachtet. Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen, in einem 15 ml-Falconröhrchen zusammengeführt und 5 min bei 250 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in reinem FCS aufgenommen. Nun wurde die Suspension mit der gleichen Menge eines Gemisches aus 80% Astrozytenmedium (M20) und 20% DMSO tropfenweise überschichtet und sofort in Cryoröhrchen überführt. Diese wurden durch langsames Abkühlen bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2. Eingesetzte Methoden zur Kultivierung der Zellen

Die Astrozyten wurden im Brutschrank bei 37°C in feuchter Atmosphäre unter 21 Vol.-% Sauerstoff und 5 Vol.-% Kohlendioxid kultiviert. Um eine gute Entwicklung der Zellen zu gewährleisten, wurde das Medium, in Abhängigkeit von der Zelldichte auf der Kulturschale, alle 3 bis 4 Tage gewechselt.

Kulturmedium

Astrocyte Basal Medium (M20)

Beschichtung der Zellkulturschalen

Für die Kultur von Astrozyten ist es notwendig, die Kulturschalen vor dem Aussäen der Zellen zu beschichten, damit diese sich anheften können.

Auf die Kulturschalen, 96-Well-Mikrotiterplatten (M71) oder Objektträger (M70) wurde vor dem Aussäen der Zellen soviel einer Lösung aus Poly-L-Lysin-Hydrobromid der Konzentration 10 ng/ml gegeben, dass der Boden vollständig bedeckt war. Die Lösung wurde nach 40 min Einwirkungszeit wieder entfernt. Nun konnten die Astrozyten ausgesät werden.

Auftauen und Aussäen der Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde die benötigte Anzahl von Cryoröhrchen im Wasserbad auf 37°C erwärmt und anschließend ihr Inhalt in 10 ml Zellkulturmedium zusammengeführt. Die Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur 4 min bei 150 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert. Diese Reinigungsoperation wurde wiederholt. Nun konnten die Zellen auf die Zellkulturschalen ausgesät werden.

Passagieren der Astrozyten

Nach Entfernen des Mediums wurde in die Zellkulturflaschen konfluent gewachsener Astrozyten jeweils 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (M19) gegeben. Die Lösung wurde durch Schwenken der Flaschen gleichmäßig verteilt und dann mit der Pipette wieder entfernt. Nach Wiederholen des Vorgangs wurde unter dem Mikroskop das Ablösen der Zellen von den Kulturflaschen beobachtet. Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und auf neue Kulturflaschen verteilt. In den Versuchen wurden Kulturen bis zur Passage 4 verwendet.

2.2.3. Charakterisierung der Zellen

Zur Charakterisierung der verwendeten Astrozytenzellkulturen wurden verschiedene Methoden eingesetzt. Dabei war es das Ziel, das Vorliegen von Astrozyten zu bestätigen und eventuelle Verunreinigungen durch Perizyten, glatte Muskelzellen, Fibroblasten oder Endothelzellen aufzuspüren.

Neben morphologischen Unterscheidungsmerkmalen wurden auch hier Methoden der Immunhistochemie eingesetzt. Als Positivkontrolle diente der Nachweis der von Astrozyten exprimierten Proteine glial-fibrillary-acidic-protein (GFAP) und α -smooth-muscle-actin. Der Nachweis des Fehlens des von-Willebrand-Faktors fand als Negativkontrolle Verwendung.

Nach dem Vorbeschichten der Objektträger mit Poly-L-Lysin-Hydrobromid wurden die Astrozyten ausgesät. Bis zur Konfluenz der Zellen wurde in regelmäßigen Abständen ein Mediumwechsel durchgeführt.

Die Nachweise von GFAP, von-Willebrand-Faktor und α -smooth-muscle-actin wurden, wie bei den Endothelzellen beschrieben, durchgeführt (s. Kapitel II.2.1.3.).

3. Zytotoxizitätstest, Vitalzählung und Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

3.1. Zytotoxizitätstest

Die Fragestellung, ob volatile Anästhetika unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen einen letal schädigenden Einfluss auf mikrovaskuläre Endothelzellen oder Astrozyten haben, wurde mit einem Zytotoxizitätstest untersucht.

Hierbei wurde mit dem CellTiter 96AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (M28) die relative Anzahl lebender Zellen nach 6-stündiger Einwirkung der Anästhetika bestimmt. Zum Vergleich diente stets eine Kontrollgruppe, deren Zellen 6 h im Brutschrank verblieben waren, wobei deren relative Anzahl lebender Zellen auf 100% gesetzt wurde.

Zur Identifizierung der lebenden Zellen diente die in den Mitochondrien stattfindende Umwandlung des zugegebenen blassgelben Tetrazoliumsalzes in ein dunkelrotes Formazanprodukt; in toten Zellen ist diese Reaktion nicht mehr möglich. Das Formazanprodukt hat bei 570 nm sein Absorptionsmaximum. Die photometrisch bestimmte Absorption ist proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.

Die Zellen wurden auf 96-Well-Mikrotiterplatten (M71) ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Dann wurden sie 6 h im Kammer-System unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika inkubiert, während die Kontrollgruppe die gleiche Zeit im Brutschrank verblieb. Anschließend wurde in jedes Well 20 μ l der das Tetrazoliumsalz enthaltenden Lösung zugegeben. Dann wurden die Zellen im Brutschrank eine Stunde inkubiert. Nun konnte photometrisch die Absorption der einzelnen Wells gemessen und die relative Anzahl lebender Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe berechnet werden.

3.2. Vitalzählung

Zur Bestätigung der Ergebnisse des Zytotoxizitätstests wurde auch mit einer Vitalzählung untersucht, ob volatile Anästhetika einen zytotoxischen Einfluss auf mikrovaskuläre Endothelzellen haben.

Hierbei wurde durch Zellzählung die Anzahl lebender Zellen nach 6-stündiger Einwirkung der Anästhetika unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen

bestimmt. Zum Vergleich dienten jeweils Kontrollgruppen, deren Zellen 6 h im Brutschrank verblieben waren.

Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden auf Petrischalen (M23) ausgesät. Wenn sie Konfluenz zeigten, wurden sie 6 h im Kammersystem unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika inkubiert, während die Kontrollgruppe die gleiche Zeit im Brutschrank verblieb. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Petrischale einmal mit PBS gewaschen.

Nach Zugabe von 8 ml Trypsin-EDTA (M19) folgte die Inkubation der Schale für 5 min im Brutschrank. Nun ließ sich unter dem Mikroskop die Ablösung der Zellen beobachten. Die Zell-Trypsin-Suspension wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen transferiert, in das 2 ml FCS (M14) gegeben wurden. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 150 g) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 10 ml Medium aufgenommen und mehrfach in der Pipette suspendiert.

100 μ l der Suspension wurden mit 100 μ l Trypanblaulösung (Trypanblau in PBS 1:4) vermischt. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer konnte jetzt die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt werden. Lebende Zellen lassen sich von toten dadurch unterscheiden, dass bei toten Zellen aufgrund erhöhter Membranpermeabilität das Zytoplasma blau gefärbt ist.

3.3. Bestimmung der Gesamteproteinkonzentration in mikrovaskulären Endothelzellen

Für die Untersuchung der Frage, ob volatile Anästhetika unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen die Gesamteproteinkonzentration in Zelllysaten und Zellkulturüberständen mikrovaskulärer Endothelzellen quantitativ beeinflussen, wurde folgender Versuch durchgeführt: Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden auf Petrischalen (M23) ausgesät und kultiviert, bis sie einen konfluenten Monolayer bildeten. Am Versuchstag wurden das Medium entfernt, die Zellen mit PBS (M25) gewaschen und anschließend die Petrischalen mit je 4 ml BMEC-Medium ohne FCS (M8) befüllt. Nun erfolgte die Inkubation im Kammersystem unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika. Kontrollkulturen verblieben im Brutschrank. Nach 6 Stunden wurden die Petrischalen entnommen und die Zellen unter dem Mikroskop auf eventuelle morphologische Veränderungen oder Ablösungen von der Petrischale untersucht.

Anschließend wurden die Zellkulturüberstände von je drei Petrischalen der gleichen Versuchsgruppe in ein auf Eis lagerndes 15 ml Falcon-Röhrchen (M15) transferiert und 12 μ l PMSF-Lösung (Proteaseinhibitor) der Konzentration 0,57 mol/l hinzugegeben. Um abgestorbene Zellen aus den Medien zu entfernen, wurden die

Falconröhrchen 5 min bei 250 g abzentrifugiert und die Überstände in neue Röhrchen überführt. Die Proteinkonzentration wurde erhöht, indem die Überstände später im Gefriertrockner bei -1°C getrocknet und anschließend in je 0,5 ml Wasser aufgenommen wurden.

Zur Gewinnung der Zellysate wurden die Zellen mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von jeweils 500 μ l Lysispuffer (M36) je Petrischale wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und die Lysate von jeweils drei Petrischalen der gleichen Versuchsgruppe in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt, das auf Eis gelagert wurde. Nun wurden die Zellysate durch Ultraschall homogenisiert und konnten bei Bedarf bei -80°C eingefroren werden.

Die Gesamtproteinkonzentration in Zellysaten und Zellkulturüberständen mikrovaskulärer Endothelzellen wurde mit dem Bio-Rad DC Protein Assay (M38) bestimmt. Die Methode beruht auf einer abgewandelten Form der Lowry Reaktion, bei der Proteine mit alkalischer Kupfertartratlösung und Folinreagenz reagieren und dadurch zu einer Farbentwicklung führen, die photometrisch bestimmt werden kann. Die gemessene Absorption ist proportional zur Proteinkonzentration der Testlösung.

Für die Farbentwicklung sind zwei Schritte nötig: die Reaktion zwischen dem Protein und den Kupferionen und die sich daran anschließende Reduktion des Folin-Reagenz durch das kupferbehandelte Protein. Das reduzierte Folin-Reagenz zeigt eine Blaufärbung mit Absorptionsmaximum bei 750 nm.

Je 5 μ l der Probenlösung (Lysate oder Überstände) wurden in eine 96-Well-Platte (M72) pipettiert. Dazu wurden jeweils 25 μ l der Lösung A' (enthält die alkalische Kupfertartratlösung) und 200 μ l der Lösung B (enthält das Folinreagenz) gegeben. Die 96-Well-Platte wurde vorsichtig geschüttelt und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun konnte photometrisch die Absorption bei 750 nm gemessen werden. Bei jeder Proteinkonzentrationbestimmung wurde gleichzeitig die Absorption eines Proteinstandards (200-1200 μ g Protein/ml) bestimmt, anhand dessen die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden konnte.

4. Permeabilitätsmessungen am *in vitro* Modell der Blut-Hirn-Schranke

4.1. Aufbau des *in vitro* Modells der Blut-Hirn-Schranke

Das *in vitro* Modell der Blut-Hirn-Schranke (Abb. 6) bestand aus mikroporösen Filtermembran-Inserts (M29) aus hydrophilem Polycarbonat (0,4 μ m Porengröße),

die mit Kollagen (M22) beschichtet und in 24-Well-Platten (M30) eingesetzt wurden.

Ähnlich dem *in vivo* Aufbau von Hirnkapillaren, bei dem die Endothelzellen auf der dem Lumen abgewandten Seite vollständig von einer Basallamina umgeben sind, die als einen Hauptbestandteil Kollagen enthält, hefteten sich auf die Filtermembran ausgesäte mikrovaskuläre Endothelzellen an der Kollagenmatrix an und bildeten nach einigen Tagen einen konfluenten Monolayer. Somit ließ sich das *in vitro* Modell in ein luminales Kompartiment (die apikale Kammer oberhalb des Endothelzellmonolayers; entsprach der Blut-Seite) und ein abluminale Kompartiment (die basolaterale Kammer unterhalb/seitlich der Filtermembran; entsprach der Gehirn-Seite) unterteilen.

Die Permeabilität des *in vitro* Modells der Blut-Hirn-Schranke konnte gemessen werden, indem die Passage geeigneter Stoffe aus der apikalen Kammer über den Endothelzellmonolayer in die basolaterale Kammer gemessen wurde, entsprechend dem Übertritt von Stoffen aus dem Blut ins Gehirn.

Hierzu wurden Marker, deren Passage über den Endothelzellmonolayer parazellulärer Art war, in das Zellmedium der apikalen Kammer gegeben. Nun wurden die Zellen unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen in Gegenwart oder Abwesenheit eines der volatilen Anästhetika inkubiert. Anschließend wurden Proben aus der basolateralen Kammer entnommen und die Konzentration des übergetretenen Markers darin bestimmt. Die Höhe dieser Konzentration diente als Maß für die Höhe der Permeabilität des *in vitro* Modells der Blut-Hirn-Schranke gegenüber diesem Marker in dieser Versuchsgruppe.

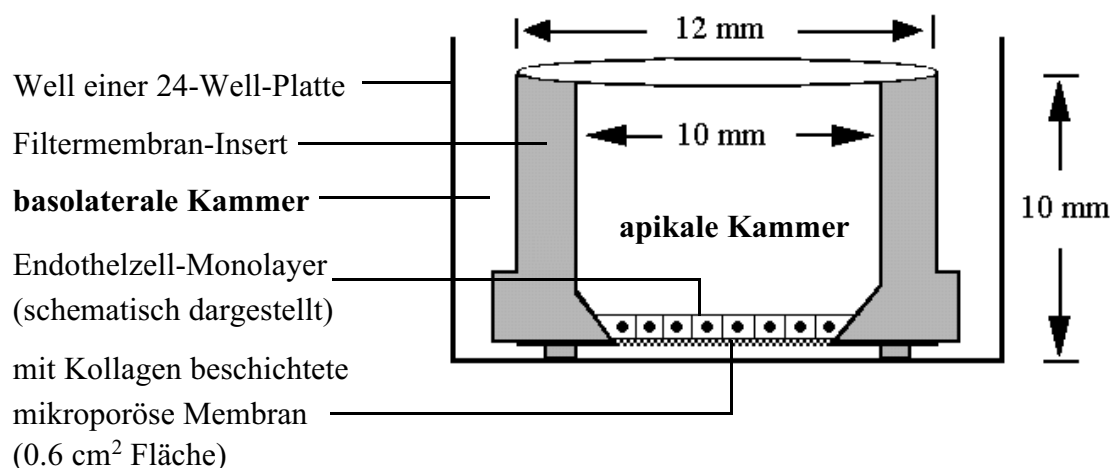


Abb. 6: Darstellung des *in vitro* Modells der Blut-Hirn-Schranke.

Mikroporöse Filtermembran-Inserts wurden, wie in Kapitel II.2.1.2. beschrieben, mit Kollagen beschichtet und in 24-Well-Platten eingesetzt.

Am darauffolgenden Tag wurden die mikrovaskulären Endothelzellen auf die Filtermembranen ausgesät und 4-6 Tage bis zur Konfluenz kultiviert, wobei stets Kulturmedium (M21) in beide Kammern gegeben wurde. Nun wurde der elektrische Widerstand über den Endothelzellmonolayer bestimmt, der ein Maß für die Ionenpermeabilität und damit für die Ausprägung der Interzellularverbindungen darstellte. Ein (erwünschter) hoher Widerstandswert ließ auf die komplexe Ausbildung von tight junctions zwischen den Zellen und damit auf einen relativ „dichten“ Monolayer schließen, der für Permeabilitätsstudien geeignet war. Zur Widerstandsmessung tauchte eine Elektrode des Messgerätes in das Zellmedium der apikalen Kammer, die andere in das Zellmedium der basolateralen Kammer. Die gemessenen Widerstandswerte lagen zwischen 70 und 120 Ωcm^2 . Filter, die Widerstände über 100 Ωcm^2 aufwiesen, wurden in den Permeabilitätsversuchen eingesetzt.

4.2. Evans blue Albumin (EBA)-Lösung

Der Farbstoff Evans blue (6,6'-[(3,3'-dimethyl [1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl) bis (azo)] bis [4-amino-5-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonic acid]) hat die Eigenschaft, fest und dauerhaft an Albumin zu binden. Das so erhaltene Evans blue Albumin (EBA) hat ein spektralphotometrisches Absorptionsmaximum bei 620 nm und ein durchschnittliches Molekulargewicht von 69 kD. Da EBA einen Endothelzellmonolayer hauptsächlich parazellulär passiert, lässt es sich als Marker verwenden⁸⁹.

Als Vorratslösung wurde eine Lösung des Evans blue Farbstoffs in Wasser mit der Konzentration 0,1 g/ml hergestellt. Diese wurde filtriert und konnte bei 4°C längere Zeit aufbewahrt werden.

670 μl dieser Vorratslösung wurden in 100 ml 4%igem BSA (Rinderserumalbumin; M31) in M199-Medium (M32) gelöst und über 30 min gerührt, um die Bindung des Farbstoffes an das Albumin zu beschleunigen.

Um ungebundene Evans blue Moleküle zu entfernen, wurde die Lösung über Nacht gegen 4 l PBS dialysiert. Schließlich wurde die EBA-Lösung steril filtriert (Filter mit 0,4 μm Porengröße) und bei 4°C aufbewahrt.

4.3. Lösung von Tritium-markiertem Inulin ($[^3\text{H}]$ -Inulin)

Inulin ist ein Polysaccharid aus D-Fructose mit einem Molekulargewicht von 5,2 kD. Es passiert Endothelzellmonolayer ausschließlich parazellulär. Wird es mit Tritium radioaktiv markiert, so lässt es sich als Marker einsetzen ⁹⁰.

$[^3\text{H}]$ -Inulin (M33) wurde als Lyophilisat bezogen. Es wurde eine Vorratslösung der Konzentration $1\ \mu\text{Curie}/\mu\text{l}$ in Wasser hergestellt und bei -20°C gelagert. Am Versuchstag wurde $1\ \mu\text{l}$ der $[^3\text{H}]$ -Inulin Lösung mit 1 ml M199-Medium gemischt.

4.4. Versuchsdurchführung: Passage von EBA oder $[^3\text{H}]$ -Inulin über den Endothelzellmonolayer

Die 24-Well Platten mit den Filtermembran-Inserts wurden aus dem Brutschrank genommen und das Medium wurde entfernt. Die Filtermembranen wurden mit einigen Tropfen PBS gewaschen. Nun wurden jeweils $350\ \mu\text{l}$ der EBA- bzw. $[^3\text{H}]$ -Inulin-Lösung in die apikale Kammer (die der luminalen Seite der Kapillaren entsprach) der Filtermembranen gegeben. Die basolaterale Kammer (die der abluminalen Seite der Kapillaren entsprach) wurde mit $450\ \mu\text{l}$ M199-Medium befüllt.

Die 24-Well-Platten wurden nun im Kammersystem unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen in Gegenwart oder Abwesenheit eines der volatilen Anästhetika inkubiert. Die gewünschte Gaskonzentration wurde dabei, wie in Kapitel II.1.2. beschrieben, eingestellt. Eine Kontrollgruppe verblieb im Brutschrank. Nach 6 h wurden die 24-Well-Platten wieder entnommen und Proben abgenommen zur Messung der Konzentration des von der apikalen Kammer über den Zellmonolayer in die basolaterale Kammer übergetretenen EBA bzw. $[^3\text{H}]$ -Inulin. Dazu wurde mit der Pipettenspitze zweimal der Inhalt der basolateralen Kammer vorsichtig durchmischt und schließlich $100\ \mu\text{l}$ entnommen. Die Proben wurden in 96-Well-Platten (EBA) (M72) bzw. in Szintillationröhrchen ($[^3\text{H}]$ -Inulin) (M35) überführt. In jedes Szintillationsröhrchen wurde 4 ml Szintillationscocktail (M34) gegeben.

Die Auswertung erfolgte photometrisch mit einem 96-Well-Plattenlesegerät über die Absorption bei 620 nm (EBA) bzw. im Szintillationscounter über den cpm-Wert ($[^3\text{H}]$ -Inulin). Pro Versuchsgruppe wurden 8-12 Filtermembran-Inserts eingesetzt. Für die Auswertung wurde in jeder Versuchsgruppe der Mittelwert der gemessenen Absorptionswerte (EBA) oder cpm-Werte ($[^3\text{H}]$ -Inulin) gebildet. In jedem Versuch wurde eine Kontrollgruppe eingesetzt, die für die Versuchsdauer im Brutschrank inkubiert wurde. Der Mittelwert dieser Kontrollgruppe wurde gleich 100% gesetzt und die Mittelwerte der Versuchsgruppen als %-Zahl auf die Kontrollgruppe bezogen angegeben. Ein gegenüber der Kontrollgruppe (100%) erhöhter Wert sprach somit für

eine erhöhte Permeabilität dieser Versuchsgruppe gegenüber EBA oder [^3H]-Inulin.

5. Bestimmung der VEGF-Expression in mikrovaskulären Endothelzellen

In den nachfolgenden Experimenten wurde durch Northern-Blot, Western-Blot und ELISA untersucht, ob volatile Anästhetika unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen einen Einfluss auf die quantitative Expression des vascular endothelial growth factor (VEGF) in mikrovaskulären Endothelzellen haben.

5.1. Versuchsdurchführung

Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden auf Petrischalen (M23) ausgesät und kultiviert, bis sie einen konfluenten Monolayer bildeten. Am Versuchstag wurden das Medium entfernt, die Zellen mit PBS (M25) gewaschen und anschließend die Petrischalen mit je 4 ml BMEC-Medium ohne FCS (M8) befüllt. Nun erfolgte die Inkubation im Kammer-System unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen in Gegenwart oder Abwesenheit eines der volatilen Anästhetika. Nach 6 Stunden wurden die Schalen entnommen und unter dem Mikroskop auf eventuelle Zellablösungen untersucht.

Zellkulturüberstände

Anschließend wurden die Zellkulturüberstände von je drei Petrischalen der gleichen Versuchsgruppe in ein auf Eis lagerndes 15 ml Falcon-Röhrchen (M15) transferiert und 12 μl PMSF-Lösung (Proteaseinhibitor) der Konzentration 0,57 mol/l hinzugegeben. Um abgestorbene Zellen aus den Zellkulturüberständen zu entfernen, wurden die Falconröhrchen 5 min bei 250 g abzentrifugiert und die Überstände in neue Röhrchen überführt. Die Proteinkonzentration wurde erhöht, indem die Überstände später im Gefriertrockner bei -1°C getrocknet und anschließend in 0,5 ml Wasser aufgenommen wurden.

Je nachdem, ob die Zellysate für Northern-Blot oder Western-Blot / ELISA verwendet werden sollten, wurde nun verschieden vorgegangen:

Zellysate für Northern-Blot

Wegen der Instabilität der RNA wurden sämtliche bei der Aufbereitung des Zellysates eingesetzten Eppendorfgläser, Pipettenspitzen etc. vor Benutzung autoklaviert, um RNAsen zu inaktivieren.

Die Zellen wurden nach Abnahme der Zellkulturüberstände mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von jeweils 650 µl Guanidiniumthiocyanatpuffer (M37) wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und das Lysat jeweils einer Petrischale in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt. Die Zellysate konnten nun bei -80°C eingefroren werden oder sofort weiter aufbereitet werden.

Zellysate für Western-Blot / ELISA

Die Zellen wurden nach Abnahme der Zellkulturüberstände mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von jeweils 500 µl Lysispuffer (M36) wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und die Lysate von jeweils drei Petrischalen der gleichen Versuchsgruppe in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt, das auf Eis gelagert wurde. Nun wurden die Zellysate durch Ultraschall homogenisiert und konnten bei Bedarf bei -80°C eingefroren werden.

5.2. Northern-Blot-Analyse

Der Northern-Blot ist ein spezifisches und empfindliches Verfahren, um mRNA-Expression nachzuweisen.

Die Zellysate wurden, wie in Kapitel II.5.1. beschrieben, gewonnen.

Aufbereitung der Zellysate

Die Aufbereitung der Zellysate erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi ⁹¹.

Die Zellsuspensionen wurden zum Homogenisieren sechsmal durch eine Injektionskanüle (22G) gezogen. Nach Zugabe von je 65 µl Natriumacetat (2 M, pH 4,0), 650 µl wassergesättigtem Phenol und 130 µl einer Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (Verhältnis 49 : 1) wurden die Proben 30 Sekunden gevortext und anschließend 15 min auf Eis gelagert. Die Proben wurden dann bei 13600 g 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Die nun oben entstandene wässrige Phase, die die RNA enthielt, wurde in ein neues 2 ml-Eppendorfgefäß überführt, die Inter- und Phenolphase, die die DNA und die Proteine enthielt, wurde verworfen.

Die Proben wurden mit je 700 µl -20°C kaltem Isopropanol versetzt und eine Stunde bei -20°C gelagert, um so die RNA zu präzipitieren.

Anschließend wurde abzentrifugiert (15 min, 13600 g, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 700 µl 70%igem Ethanol aufgenommen. Wieder wurde abzentrifugiert (5 min, 13600 g, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl Guanidiniumthiocyanatpuffer (M37) aufgenommen. Nun wurden jeweils drei

Proben der gleichen Versuchsgruppe in einem 2 ml-Eppendorfgefäß vereinigt. Nach Zugabe von je 900 μl -20°C kaltem Isopropanol wurden die Proben eine Stunde bei -20°C gelagert, um erneut die RNA zu präzipitieren. Wieder wurde abzentrifugiert (15 min, 13600 g, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal durch Aufnehmen in 700 μl 70%igem Ethanol (-20°C), Abzentrifugieren (5 min, 13600 g, 4°C) und Verwerfen des Überstandes gewaschen. Schließlich wurden die Proben im Vakuumtrockner getrocknet und in je 15 μl Wasser aufgenommen.

Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration wurde durch spektralphotometrische Messung bestimmt. Da die Messung im ultravioletten Licht erfolgte, Glas- und alle gängigen Kunststoffküvetten jedoch UV-Licht absorbieren, erfolgte die Messung in Quarzküvetten.

Jeweils 1 μl der aufbereiteten RNA-Probe wurde mit 69 μl Wasser verdünnt und die Absorptionen bei 260 und 280 nm bestimmt.

Für die Konzentration der RNA in der Lösung galt:

$$c [\mu\text{g/ml}] = A_{260\text{nm}} \cdot n \cdot f$$

- c = Konzentration der unverdünnten RNA-Lösung
 $A_{260\text{nm}}$ = Absorption bei 260 nm
 n = Eichfaktor (hier $n = 40$)
 f = Verdünnungsfaktor der gemessenen RNA-Lösung (hier $f = 70$)

Der Quotient $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ war ein Maß für die RNA-Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Da Proteine bei 280 nm absorbieren, war ein kleinerer Quotient ein Hinweis auf eine Proteinverunreinigung der Probe.

Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden jeweils 35 μl reinen Ethanols hinzugegeben. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese bietet die Möglichkeit, durch Phosphatgruppen negativ geladene Moleküle (RNA, DNA) in einem elektrischen Feld je nach Kettenlänge aufzutrennen, denn große Moleküle wandern langsamer, kleine Moleküle schneller in Richtung Anode.

Zur Herstellung eines 1%igen Formaldehyd-Agarosegels wurden 2,5 g Agarose mit 25 ml MOPS-Lösung (M57), Konzentrationsfaktor 10, und 210 ml Wasser versetzt. Dieses Gemisch wurde in der Mikrowelle zum Sieden erhitzt, bis sich eine klare

Lösung bildete. Nach Zugabe von 13 ml Formaldehyd-Lösung (37%ig) wurde die Lösung sofort in die Apparatur gegossen. In der Zeit bis zur Verfestigung wurden die aufzutrennenden Proben wie folgt vorbereitet:

Es wurden jeweils 15 μ g Gesamt-RNA im Vakuumtrockner getrocknet und in 16 μ l Probenauftragspuffer (M58) aufgenommen. Zur Denaturierung der RNA wurden die Proben 10 min bei 65°C unter Schütteln inkubiert. Nachdem 2 l MOPS-Lösung (M57) auf das inzwischen verfestigte Gel gegossen worden waren, wurden die Proben schließlich aufgetragen.

Es wurde eine Spannung von 200 mV angelegt. Die Laufzeit betrug etwa 3 h.

Nach der Gelelektrophorese wurde die Qualität der RNA-Proben unter UV-Licht beurteilt und fotografisch dokumentiert. Dabei wurde die Eigenschaft des im Probenauftragspuffer enthaltenen Ethidiumbromid genutzt, mit RNA zu reagieren. Da Ethidiumbromid unter UV-Licht fluoresziert, konnten so RNA-Moleküle als Banden auf dem Gel sichtbar gemacht werden, vorausgesetzt, es war eine ausreichend große Nukleinsäuremenge vorhanden (mindestens 25 ng)⁹². Die charakteristischen Merkmale für RNA sind die 18S- und 28S-Banden. S steht für Svedberg-Einheit. Die 18S-Bande entspricht einer Größe von 2366 Nukleotiden, bei der 28S-Bande liegen 6333 Nukleotide vor⁹³.

Das Gel wurde anschließend in SSC-Lösung (M60), Konzentrationsfaktor 2, gewaschen.

Blot

Beim Northern-Blot wird elektrophoretisch aufgetrennte RNA durch kapilläre Kräfte aus dem Gel auf eine immobilisierende Nylonmembran übertragen. Die Membran ist positiv geladen und ermöglicht so eine elektrostatische Bindung der negativ geladenen RNA-Moleküle. Eine kovalente und damit dauerhafte Fixierung der Nukleinsäuren an die Nylonmembran erfolgt durch sogenanntes „Crosslinken“ mit UV-Licht. Dieses aktiviert Thymin- und Uracilreste der RNA, die daraufhin mit den primären Amingruppen der Nylonmembran reagieren.

Die Blot-Apparatur (Abb. 7) bestand aus zwei mit SSC-Lösung (Konzentrationsfaktor 10) gefüllten Wannen, auf die eine Platte gelegt wurde. Auf diese Platte wurde etwa 10 cm hoch Zellstoff gestapelt, gefolgt von zwei Lagen 3MM Papier (M43) (mit SSC-Lösung, Konzentrationsfaktor 10, angefeuchtet), einer Nylonmembran (M61) (ebenfalls mit SSC-Lösung, Konzentrationsfaktor 10, angefeuchtet) und dem Gel, das luftblasenfrei aufgelegt wurde. Das Gel wurde mit zwei doppelten Streifen 3MM Papier, die an beiden Enden in die mit SSC-Lösung, Konzentrationsfaktor 10,

gefüllten Wannen reichten, vollständig bedeckt. Eine Platte und ein Gewicht zum Beschweren bildeten den Abschluss nach oben.

Es wurde über Nacht geblottet (etwa 16 Stunden lang).

Anschließend wurde die Membran in SSC-Lösung, Konzentrationsfaktor 2, gewaschen und zwischen zwei Lagen 3MM Papier getrocknet. Unter UV-Licht wurden die 18S- und 28S rRNA Banden auf der Membran markiert. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte durch „Crosslinken“ in einem UV-Stratalinker.

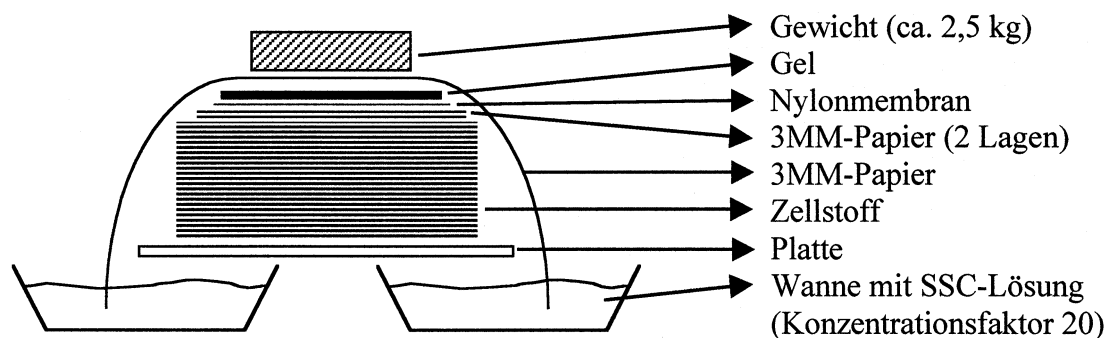


Abb. 7: Aufbau der Blot-Apparatur.

Vorhybridisierung

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran 3 h bei 42°C in Hybridisierungspuffer (M62) vorhybridisiert. Es wurden pro Hybridisierungsröhre 10 ml Hybridisierungspuffer benutzt.

Synthese radioaktiv markierter cDNA-Sonden

Die Herstellung der Gensonden erfolgte mit dem RediPrime-DNA-labelling System (M63). Es wurden 25 ng eines humanen VEGF cDNA-Inserts (M64) mit Wasser auf 45 µl verdünnt und im kochenden Wasserbad 5 min denaturiert. Die Probe wurde zum Labelling-Mix hinzugefügt und beides durch leichtes Schütteln durchmischt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden nun 3-5 µl [³²P]dCTP (370 Mbq/ml)(M65) hinzugefügt und die Probe 10 min bei 37°C inkubiert.

Messung des Anteils des eingebauten [³²P]dCTP in die cDNA-Fragmente

Eine Einbaukontrolle des [³²P]dCTP in die cDNA-Fragmente erfolgte durch Papierchromatographie. Ein Tropfen der Probe wurde auf ein Chromatographiepapier aufgetragen und mit Kaliumphosphat-Puffer der Konzentration 0,5 mol/l als Laufpuffer aufgetrennt. Anschließend wurde das Chromatographiepapier unter einer Rotlichtlampe getrocknet und in einen oberen und unteren Abschnitt unterteilt. Der

obere Abschnitt enthielt die eingebauten [³²P]dCTP-Nukleotide. Der untere Abschnitt enthielt die nicht eingebauten, freien Nukleotide, die schneller gelaufen waren. Im Szintillationszähler wurde die Radioaktivität beider Abschnitte gemessen.

$$\text{Einbau} = \frac{\text{cpm}[\text{oberer Abschnitt}]}{\text{cpm}[\text{oberer Abschnitt}] + \text{cpm}[\text{unterer Abschnitt}]}$$

Radioaktive Hybridisierung

Der Labelling-Mix wurde nach der Einbaukontrolle aufgekocht, kurz abzentrifugiert und in die Hybridisierungsröhren zu Membran und Hybridisierungspuffer gegeben. Es wurde über Nacht bei 42°C hybridisiert.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran gewaschen. Dies erfolgte mit Waschpuffer (SSC-Lösung, Konzentrationsfaktor 2, mit 0,1% SDS) zweimal 10 min bei Raumtemperatur und einmal 15 min bei 42°C im Wasserbad unter leichtem Schütteln.

Auswertung

Die Membran wurde in Folie eingepackt, in eine Kassette mit Phosphorscreen-deckplatte gelegt und dort mehrere Stunden belassen. Mit dem Phosphorimager wurden anschließend die Signale auf dem Screen detektiert und konnten mit dem Computer-Programm ImageQuant quantifiziert werden.

Zusätzlich wurde die Membran in einer Röntgenkassette drei Tage bei -80°C gegen einen Röntgenfilm (M66) exponiert. Dieser wurde dann entwickelt.

Dehybridisierung der Membranen

Nach Entfernen der radioaktiven Probe von der Membran konnte diese für eine weitere Hybridisierung verwendet werden. Dazu wurde sie mit siedender 0,1%iger SDS-Lösung übergossen und bei Raumtemperatur 30 min lang geschwenkt.

18S cDNA Hybridisierung

Um eventuelle Unterschiede in den Gesamt-RNA-Mengen der aufgetragenen Proben festzustellen, wurde die Membran zuletzt mit einer radioaktiv markierten 18S cDNA-Probe hybridisiert und, wie oben beschrieben, eingemessen.

5.3. Western-Blot-Analyse

Der Western-Blot ist ein sehr spezifisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen. Quantitative Unterschiede in der Expression des nachgewiesenen Proteins können allerdings nur weniger genau beurteilt werden.

Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden Proteine in einem elektrischen Feld nach Molekulargewicht aufgetrennt, denn je höher dieses ist, umso langsamer wandert ein Protein in Richtung Anode.

Die Zellysate wurden, wie in Kapitel II.5.1. beschrieben, gewonnen.

Von jedem Zellysate wurden Proben, die eine Menge von 100 μ g Gesamtprotein enthielten, im Vakuumtrockner eingetrocknet und in 20 μ l Lämmli-Puffer (M39) mit Mercaptoethanol (im Verhältnis 12:1) aufgenommen. Die Proben wurden 10 min bei 95°C denaturiert, kurz abzentrifugiert und dann auf das Gel (M41, M42) aufgetragen. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der später detektierten Proteinbanden wurde zusätzlich zu den Proben ein Marker (M69) aufgetragen, der aus einem Gemisch farbig markierter Proteine mit bekanntem Molekulargewicht bestand.

Als Laufpuffer fand SDS-Page (M40) Verwendung. Bei 100 V hatte das Gel eine Laufzeit von ca. 2 Stunden.

Blot

Mit der Technik des Blottens ist es möglich, elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus Gelen auf immobilisierende Nitrozellulose-Membranen zu übertragen, um sie anschließend mit spezifischen Antikörpern zu detektieren. Die Fixierung der Proteine an die Membran erfolgt über elektrostatische Wirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen.

Nach Entnahme des Gels aus der Elektrophorese-Apparatur erfolgte das Blotten in einer Semi-Dry-Vorrichtung (Abb. 8). Diese bestand aus zwei horizontal angeordneten Plattenelektroden, zwischen denen der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte.

Auf die untere Plattenelektrode wurden drei Lagen 3MM-Papier (M43) gelegt, die in Transferpuffer (M44) getränkt waren. Darauf folgte die ebenfalls mit Transferpuffer befeuchtete Nitrozellulose-Membran (M45), auf die dann das Gel gelegt wurde. Den Abschluss nach oben bildeten wieder drei Lagen 3MM-Papier, die in Transferpuffer getränkt waren.

Es wurde streng darauf geachtet, dass sich zwischen Gel, Nitrozellulosemembran und 3MM-Papier keine Luftblasen befanden. Die Apparatur wurde mit dem Deckel, in den die obere Plattenelektrode integriert war, verschlossen.

Das Blotten erfolgte 30 min bei 10 V.

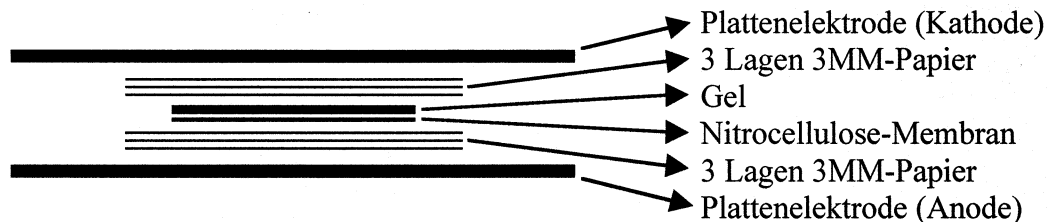


Abb. 8: Aufbau der Semi-Dry-Blot Apparatur.

Ponceaufärbung

Bei der Ponceaufärbung handelte es sich um eine reversible Anfärbung aller Proteine auf der Nitrozellulosemembran. So konnte beurteilt werden, ob die Proben, die auf das Gel aufgetragen worden waren, auch wirklich gleiche Proteinmengen enthielten. Dies war nötig, um vergleichende Aussagen über die quantitative VEGF-Expression in den Zellen unter verschiedenen Versuchsbedingungen machen zu können.

Hierzu wurde die Membran mit der Ponceaulösung (M46) überschichtet. Nach 5 min Einwirkungszeit wurde überschüssige Lösung mit Wasser entfernt und es stellten sich rot gefärbte Proteinbanden auf der Membran dar. Eventuelle Unregelmäßigkeiten im Proteingehalt der einzelnen Proben wurden nun beurteilt. Zur Dokumentation wurde die Membran abgescannt und anschließend die Färbung mit reichlich Wasser abgewaschen.

Spezifische Immunreaktionen und ECL-Detektion (Abb. 9)

Spezifische Antikörper binden an die zu detektierenden Proteine auf der Nitrozellulosemembran. An die Antikörper gekoppelte Enzyme katalysieren anschließend eine Lumineszenzreaktion. Ein gegen die Nitrozellulosemembran exponierter lichtempfindlicher Film stellt nach seiner Entwicklung die detektierten Proteine als schwarze Banden dar.

Die Membran wurde in ein 50 ml-Falconröhrchen so eingerollt, dass sich die Seite, auf die die Proteine geblottet worden waren, innen befand. Für die folgenden Schritte wurde das Falconröhrchen auf ein Rollbrett gelegt.

Um Hintergrundsignale zu verhindern, die durch unspezifische Bindungen zwischen Antikörpern und Nitrozellulosemembran entstehen, wurde die Membran eine Stunde

bei Raumtemperatur mit 5 ml 5% BSA (fettsäurefreies Rinderserumalbumin, M31) in TBST-Puffer (M47) „geblockt“.

Anschließend wurden 5 ml des ersten Antikörper zugegeben. Es wurde rabbit-anti-human-VEGF (M48) in einer Verdünnung von 1:1000 in 1%igem BSA in TBST eingesetzt. Der Antikörper wurde über Nacht bei 4°C auf der Membran belassen.

Es schloss sich das Waschen der Membran an, das mit jeweils ca. 20 ml TBST zweimal kurz, einmal 15 min und zweimal 5 min erfolgte.

Als zweiter Antikörper wurde Biotin-SP-konjugierter affinitätsgereinigter anti-rabbit-IgG (von der Ziege) (M49) eingesetzt. In einer Verdünnung von 1:50000 in 1%igem BSA in TBST wurden 5 ml eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Membran belassen.

Die Membran wurde wieder, wie oben beschrieben, mit TBST gewaschen, zusätzlich folgte jedoch noch ein Waschschrift mit ca. 20 ml TBS (M50) für 5 min.

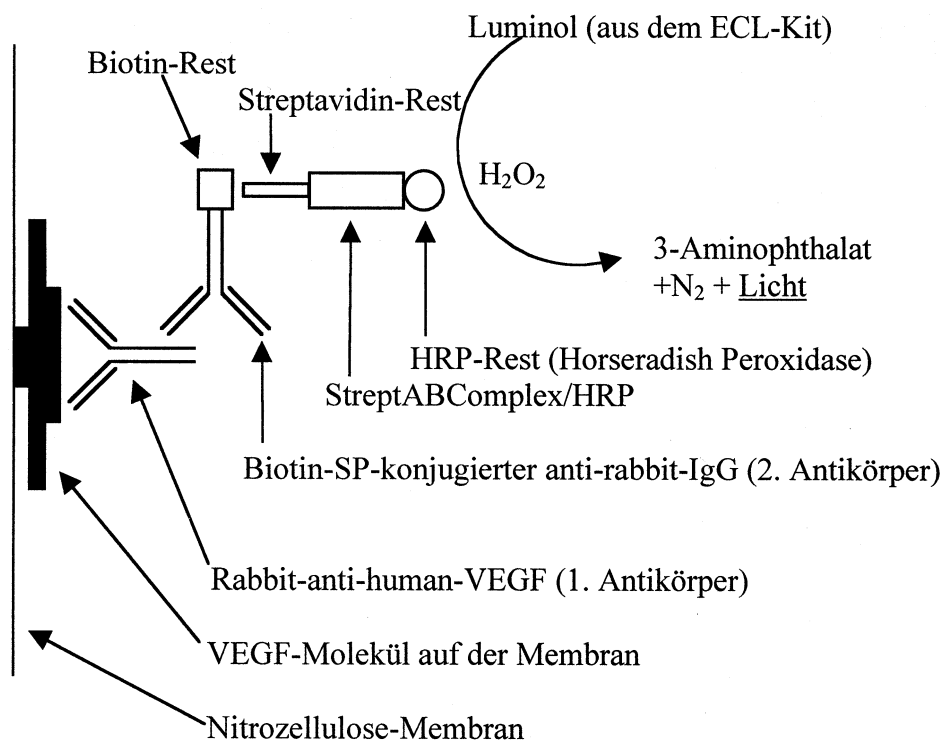


Abb. 9: Schematische Darstellung der Funktionsweise der spezifischen Immunreaktion und ECL-Detektion beim Western-Blot. Der erste Antikörper (rabbit-anti-human-VEGF) band an VEGF auf der Nitrozellulosemembran. Der zweite Antikörper (Biotin-SP-konjugierter affinitätsgereinigter anti-rabbit-IgG), an den ein Biotinrest gekoppelt war, band an den ersten Antikörper. Der Streptavidin-Rest des nun zugesetzten StreptABComplex/HRP band an den Biotin-Rest des zweiten Antikörpers; der HRP-Rest (=Horseradish Peroxidase) katalysierte beim nachfolgend eingesetzten ECL-Kit eine Luminiszenzreaktion.

Nun wurden 5 ml des StreptABComplex/HRP (M51) in der Verdünnung 1:100 in TBS auf die Membran gegeben und dort eine Stunde bei Raumtemperatur belassen.

Nach einem letzten Waschen mit jeweils ca. 20 ml TBS (zweimal kurz, einmal 15 min, zweimal 5 min) wurde die Membran wieder aus dem Falcon-Röhrchen entfernt und zur Anwendung des ECL-Reagenz auf eine Plastikschaale gelegt.

Dann wurden das ECL-Detektionsreagenz (M52) I (zerfällt zu Wasserstoffperoxid) und II (Luminol) im Verhältnis 1:1 gemischt und für eine Minute auf die Membran gegeben. Danach wurde die Lösung entfernt, die Membran in durchsichtige Verpackungsfolie (M53) eingepackt und in eine Röntgenkassette geklebt. In der Dunkelkammer wurde nun ein lichtempfindlicher Film (M54) 5-25 min in die Röntgenkassette (M56) eingelegt und anschließend entwickelt. Detektiertes VEGF stellte sich auf dem Film durch schwarze Banden dar.

5.4. Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)

Beim ELISA handelt es sich um ein Verfahren, das eine sehr genaue Quantifizierung eines spezifischen Proteins in einer Probe ermöglicht.

Quantitative Aussagen über die VEGF-Expression in Endothelzellen unter dem Einfluss volatiler Anästhetika wurden daher mit dem Human VEGF Kit (M55) gemacht. Die Zellysate und Zellkulturüberstände wurden, wie unter Kapitel II.5.1. beschrieben, gewonnen.

Das Kit bestand aus einer 96-Well-Mikrotiterplatte, die mit monoklonalen anti-human VEGF Antikörpern vorbeschichtet war, um freies VEGF der zugegebenen Probe zu binden (Abb. 10). Zur Probe (je Well 100 μ l Zellysate oder –überstand) wurden 25 μ l eines polyklonalen biotinylierten anti-human VEGF Antikörper (vom Kaninchen) gegeben, der ebenfalls an freies VEGF band. Die 96-Well-Mikrotiterplatte wurde 3 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gewaschen.

Nun wurden jeweils 50 μ l Streptavidin konjugierte Alkaline Phosphatase zugegeben, die eine Bindung mit dem Biotinrest des zuvor benutzten Antikörpers einging. Die 96-Well-Mikrotiterplatte wurde für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wieder gewaschen.

Der Phosphataserest der Streptavidin konjugierten Alkaline Phosphatase setzte bei der anschließend zugegebenen Farbreagenzlösung (je Well 200 μ l) eine Reaktion in Gang, bei der schließlich ein dunkelrotes Formazanprodukt mit Absorptionsmaximum bei 492 nm entstand.

Mit einem 96-Well-Plattenlesegerät konnte nun photometrisch die Absorption der

einzelnen Wells bestimmt werden, die proportional zur Menge des in der Probe enthaltenen VEGF war.

Bei jedem ELISA wurde gleichzeitig die Absorption eines VEGF-Standards (0-2500 pg VEGF/ml) bestimmt, anhand dessen die VEGF-Konzentrationen der Proben berechnet werden konnten.

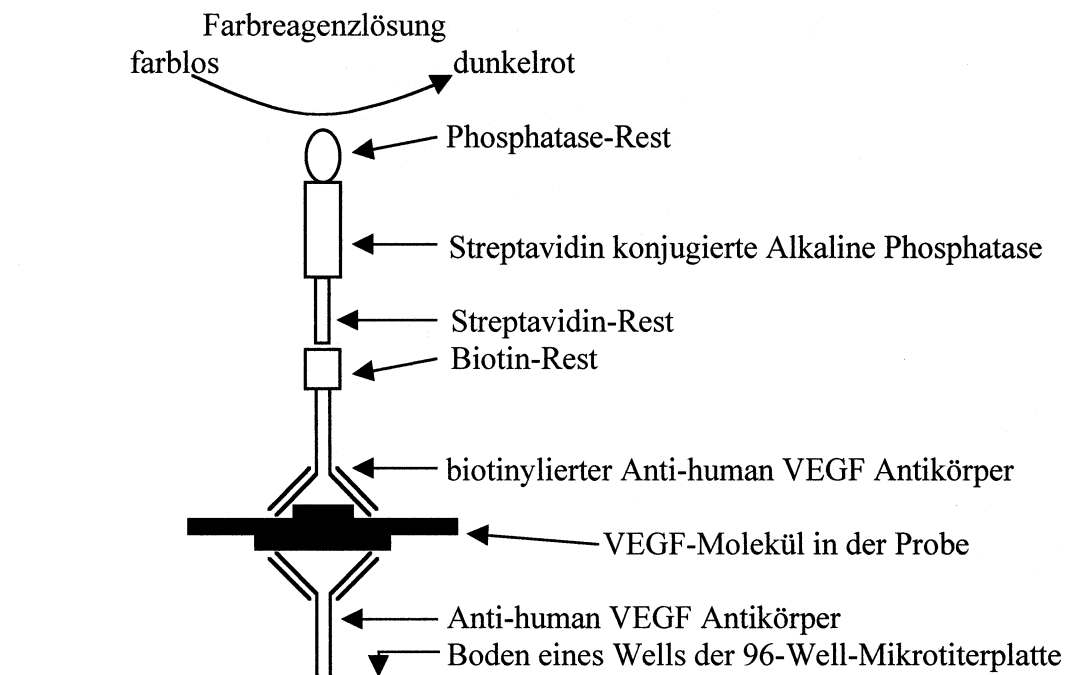


Abb. 10: Schematische Darstellung der Funktionsweise des ELISAs.

6. Statistik

Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SEM ausgedrückt. Zur Ermittlung von statistischen Unterschieden zwischen einzelnen Gruppen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Zeigte sich hier ein signifikanter Unterschied, schloss sich der Tukey Test an. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als signifikant gewertet.

III. Ergebnisse

1. Konstanz und Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen

Wie in Kapitel II.1. beschrieben, wurde für die Versuche mit den volatilen Anästhetika ein speziell entwickeltes Kammersystem eingesetzt. Die Zellkulturschalen wurden in einen auf 37°C beheizten, nach oben offenen Edelstahlzylinder gestellt, der dann mit einem Plexiglasdeckel gasdicht verschlossen wurde. Temperatur und Luftfeuchtigkeit in der Kammer wurden kontinuierlich gemessen und konnten auf einer Anzeigetafel abgelesen werden. Über eine Gaszuleitung im Deckel wurde nun mit ca. 3000 ml/min ein Gemisch aus Sauerstoff, Kohlendioxid und Stickstoff in die Kammer eingeleitet. Dadurch wurde die Luft über eine Gasableitung rasch verdrängt und eine normoxische (21 Vol.-% Sauerstoff) oder hypoxische (2 Vol.-% Sauerstoff) Atmosphäre hergestellt. Wie sich an einem Gasmonitor, der die Gaskonzentrationen in der Kammer kontinuierlich analysierte, feststellen ließ, waren nach ca. 3 min die gewünschten Gas-Sollwerte erreicht. Nach Drosselung der Gaszufuhr auf etwa 100 ml/min wurde nun mit der Zugabe des Anästhetikums begonnen, das (flüssig) über einen Perfusor in die Kammer geleitet wurde, wo es aufgrund seines hohen Dampfdruckes rasch verdunstete. Die Zustromgeschwindigkeit des Anästhetikums wurde so lange variiert, bis sich die gewünschten Gaskonzentrationen stabil eingestellt hatten. Die Kontrolle erfolgte über den Gasmonitor. Nun wurden die Gaszu- und Gasableitungen geschlossen, d.h. die Zellen waren nun in einem *geschlossenen System* unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika inkubiert. Die gesamte Prozedur vom Einsetzen der Zellkulturschalen in die Kammer bis zum Schließen der Gaszu- und Gasableitungen dauerte etwa 10 min.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden vor Entnahme der Zellkulturschalen die Konzentrationen von Sauerstoff, Kohlendioxid und Anästhetikum in der Kammer gemessen, um eventuelle Abweichungen zu den bei Versuchsbeginn eingestellten Sollwerten festzustellen. Diese Maßnahme diente der Sicherstellung konstanter und reproduzierbarer Versuchsbedingungen.

Die Konzentrationen von Sauerstoff, Kohlendioxid und Anästhetikum in der Kammer sind in der Tabelle 2 zu drei verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Die Abweichungen sind wie erkennbar sehr gering. Hauptsächlich sind sie auf eine geringe Gasdurchlässigkeit des Kammersystems nach außen zurückzuführen. Die respiratorische und metabolische Aktivität der Zellen trug sicherlich kaum zu den

Abweichungen bei, eher schon die noch in den Zellkulturschalen zwischen Zellmedium und Deckel der Kulturschale verbliebene Restluft, die erst langsam durch die Gase in der Kammer ausgetauscht wurde und so deren Konzentrationen beeinflusste.

Temperatur und Luftfeuchtigkeit im Inneren der Kammer wurden in etwa halbstündigen Abständen kontrolliert. Die Temperatur, die über einen elektronischen Regelkreis konstant gehalten wurde, wich um höchstens $\pm 0,5^\circ\text{C}$ vom Sollwert 37°C ab. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug stets zwischen 80 und 90%.

Aufgrund der geringen Abweichung der Gaskonzentrationen, der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit vom Sollwert kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen während des Versuchs in der Kammer kontinuierlich unter recht exakt definierten Bedingungen inkubiert waren und dass Versuche zudem exakt wiederholbar waren.

Tabelle 2: Konzentration [Vol.-%] von Sauerstoff (dargestellt sowohl für Versuche unter normoxischen (N) als auch unter hypoxischen (H) Bedingungen), Kohlendioxid und Narkosegas in der Kammer zu Versuchsbeginn (0 h), nach 3 h und 6 h. (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar).

	0 h	3 h	6 h
Sauerstoff (N)	21,0	$20,9 \pm 0,03$	$20,8 \pm 0,04$
Sauerstoff (H)	2,0	$3,0 \pm 0,11$	$2,8 \pm 0,11$
Kohlendioxid	5,0	$4,8 \pm 0,31$	$4,8 \pm 0,12$
Halothan	3,0	$3,0 \pm 0,07$	$2,9 \pm 0,07$
Enfluran	6,8	$6,6 \pm 0,06$	$6,5 \pm 0,07$
Isofluran	5,1	$4,8 \pm 0,05$	$4,7 \pm 0,04$
Sevofluran	8,2	$7,9 \pm 0,18$	$7,8 \pm 0,10$
Desfluran	24,0	$23,6 \pm 0,20$	$23,0 \pm 0,32$

2. Charakterisierung der Zellen

2.1. Charakterisierung von mikrovaskulären Endothelzellen

Nach der Isolierung mikrovaskulärer Endothelzellen wurde durch verschiedene Methoden überprüft, dass es sich bei den Zellen tatsächlich um Endothelzellen handelte. Außerdem wurde eine Verunreinigung der Zellkultur durch andere Zelltypen ausgeschlossen.

2.1.1. Morphologie

Mikrovaskuläre Endothelzellen wiesen das typische spindelförmige Aussehen auf. Nach 5-7 tägiger Kultur bildeten sie einen konfluenten Monolayer, d.h. sie wuchsen *nicht* mehrschichtig übereinander (Abb. 11).

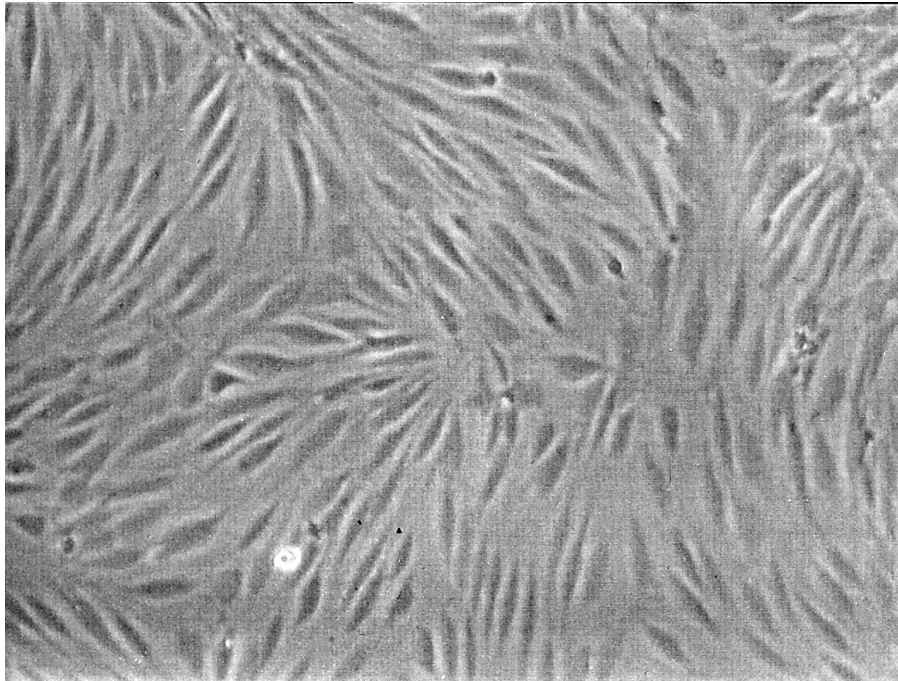


Abb. 11: Morphologie mikrovaskulärer Gehirnendothelzellen. Lichtmikroskopische Aufnahme mit Phasenkontrast eines konfluenten Monolayers. Vergrößerung 200fach.

2.1.2. LDL-Aufnahme

Beim LDL (low density lipoprotein) handelt es sich um einen hydrophilen Lipid-Protein-Komplex, der ein Haupttransportsystem für Cholesterin im Blut darstellt. Cholesterin, das ein essentieller Bestandteil von z.B. Zellmembranen ist, wird so von der Leber zu extrahepatischen Geweben befördert. Endothelzellen verfügen über die Fähigkeit zur rezeptorvermittelten Endozytose von LDL aus dem Blut. Die das LDL enthaltenden Endosomen verschmelzen dann intrazellulär mit Lysosomen, in denen schließlich der Abbau des LDL erfolgt.

Dieses Merkmal der Endothelzellen ließ sich als Positivnachweis ausnützen.

Da fast alle Zellen eine LDL-Aufnahme zeigten, handelte es sich um eine verhältnismäßig reine Endothelzellkultur (Abb. 12,13). Das Vorliegen einer Perizytenkultur konnte ausgeschlossen werden, da diese kein LDL aufnehmen können.

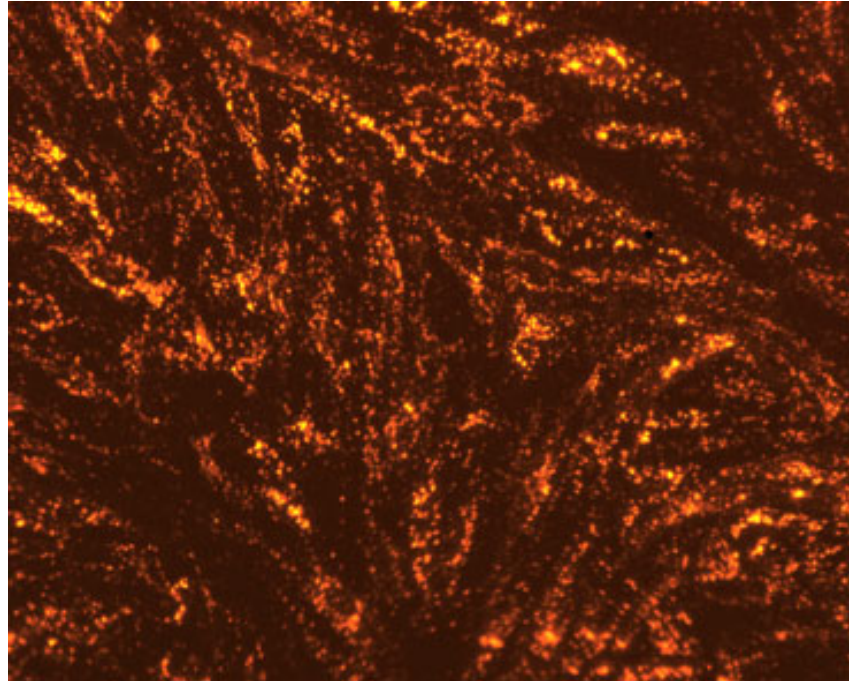


Abb. 12: Nachweis des von mikrovaskulären Endothelzellen aufgenommenen fluoreszenzmarkierten LDL. Vergrößerung 600fach. Eine konfluente Kultur mikrovaskulärer Endothelzellen wurde mit fluoreszenz-markiertem LDL 4 h im Brutschrank inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte nun in das Zytoplasma inkorporiertes LDL nachgewiesen werden (rote Fluoreszenz).

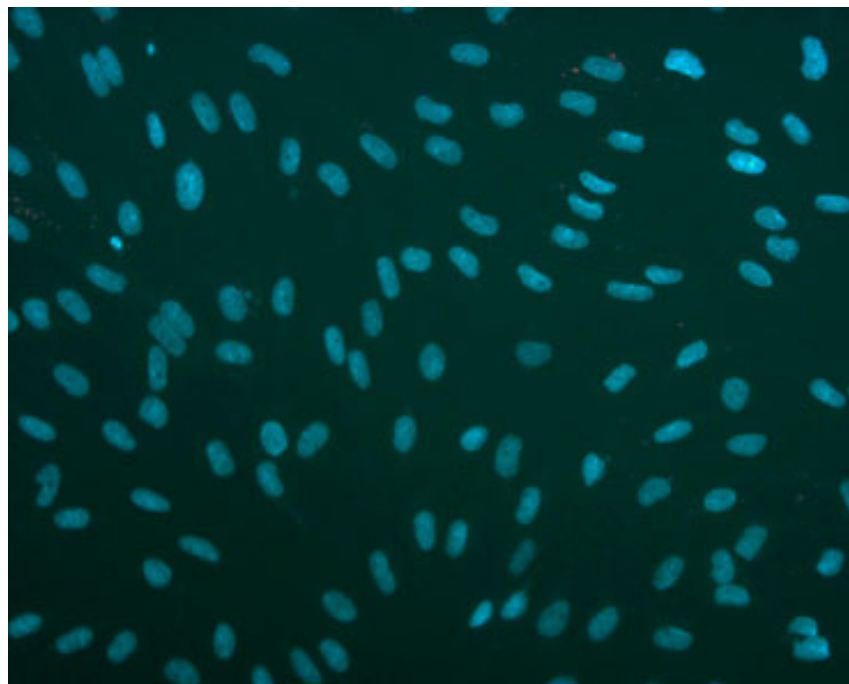


Abb. 13: Kernfärbung der mikrovaskulären Endothelzellen mit DAPI; es liegt derselbe Bildausschnitt vor wie bei Abb. 12. Vergrößerung 600fach.

2.1.3. von-Willebrand-Faktor (vWF)

Der von-Willebrand-Faktor, ein Glykoprotein, ist ein Kofaktor der Blutgerinnung, der unter anderem für die Adhäsion von Thrombozyten an das Gefäßendothel von Bedeutung ist. Endothelzellen synthetisieren den vWF, der dann sowohl in das Plasma sezerniert als auch in der subendothelialen Matrix in sogenannten Weibel-Palade-Körperchen deponiert wird.

Aufgrund der Eigenschaft der Endothelzellen, den vWF zu exprimieren und zu speichern, konnte ein weiterer Positivnachweis geführt werden. Der vWF konnte in fast jeder Zelle nachgewiesen werden (Abb. 14). Dies sprach für eine relativ reine Endothelzellkultur.

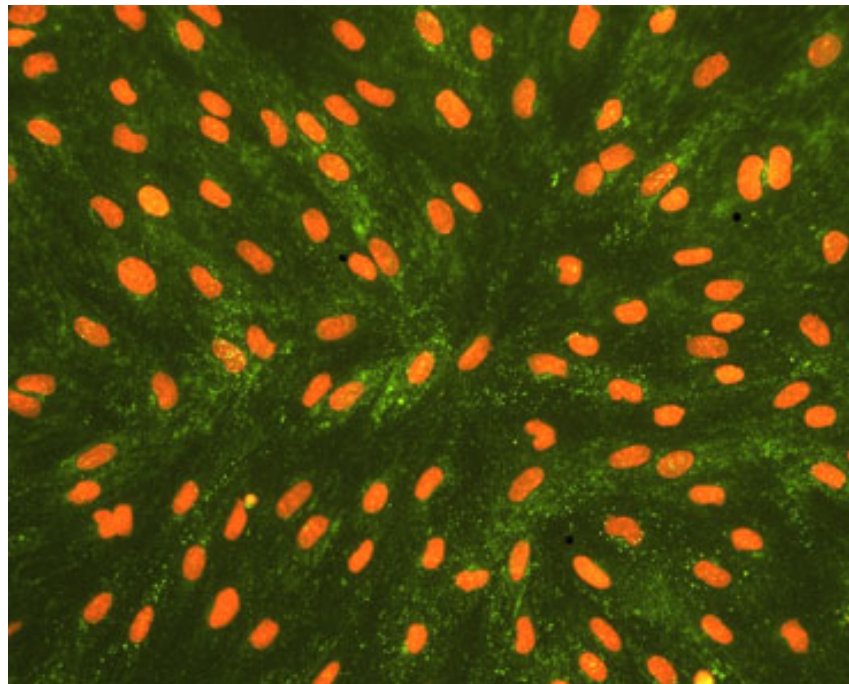


Abb. 14: Nachweis des von-Willebrand-Faktors in einer konfluenten Kultur mikrovaskulärer Endothelzellen (grüne Fluoreszenz). Kernfärbung mit Propidiumjodid (rote Fluoreszenz). Vergrößerung 600fach. Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden kultiviert, bis sie einen konfluenten Monolayer bildeten. Nun wurden die Zellen fixiert und eine Stunde mit dem ersten Antikörper (rabbit-anti-human-von-Willebrand-factor) inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die einstündige Inkubation mit dem zweiten Antikörper (biotin-conjugated-affinity-purified-donkey-anti-rabbit-IgG). Erneut wurde gewaschen und anschließend eine Stunde mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin (Cy²-conjugated-streptavidin) inkubiert. Wieder folgte ein Waschschrift. Nun wurde eine Kernfärbung mit Propidiumjodid durchgeführt. Nach einem letzten Waschschrift konnte nun mit dem Fluoreszenzmikroskop der vWF nachgewiesen werden.

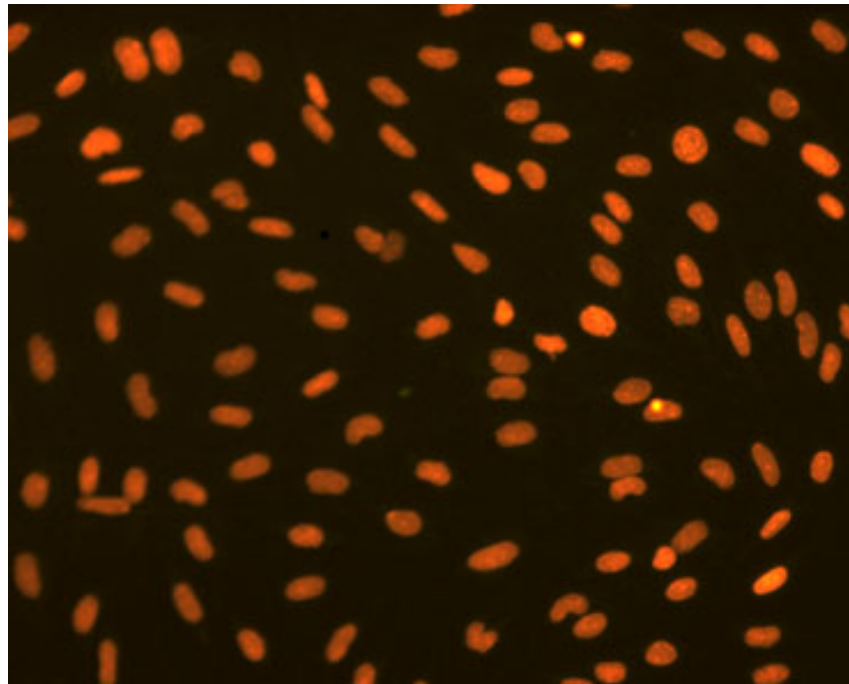


Abb. 15: Kontrolle zum Ausschluss einer Kreuzreaktion des 2. Antikörpers oder des fluoreszenzmarkierten Streptavidins mit den Zellen. Kernfärbung mit Propidiumjodid (rote Fluoreszenz). Vergrößerung 600fach. Hierbei wurden die Zellen, wie in Abb. 14 beschrieben, behandelt mit der Änderung, dass der erste Antikörper nicht zugesetzt wurde. So konnte sichergestellt werden, dass der Fluoreszenznachweis wirklich auf der Reaktion des ersten Antikörpers beruhte.

Durch Kontrollen wurde sichergestellt, dass eine Kreuzreaktion des zweiten Antikörpers oder des fluoreszenzmarkierten Streptavidins mit den Zellen nicht stattgefunden hatte.

In der Kontrolle waren ausschließlich die durch Propidiumjodid angefärbten Zellkerne sichtbar, eine Kreuzreaktion hatte daher nicht stattgefunden (Abb. 15).

2.1.4. α -smooth-muscle-actin

Das Protein α -smooth-muscle-actin findet sich in den Aktin-Filamenten glatter Muskelzellen und Perizyten. Auch Astrozyten exprimieren α -smooth-muscle-actin. Es ist dagegen *nicht* in Endothelzellen vorhanden.

Daher eignete es sich als Negativnachweis für Endothelzellkulturen. Außerdem konnte so eine Verunreinigung durch Perizyten oder glatte Muskelzellen ausgeschlossen werden.

Mit dem Fluoreszenzmikroskop konnten die angefärbten Zellkerne, jedoch *kein* α -smooth-muscle-actin nachgewiesen werden (Abb. 16). Dies bestätigte wieder die Reinheit der Endothelzellkultur: Perizyten oder glatte Muskelzellen waren keine vorhanden.

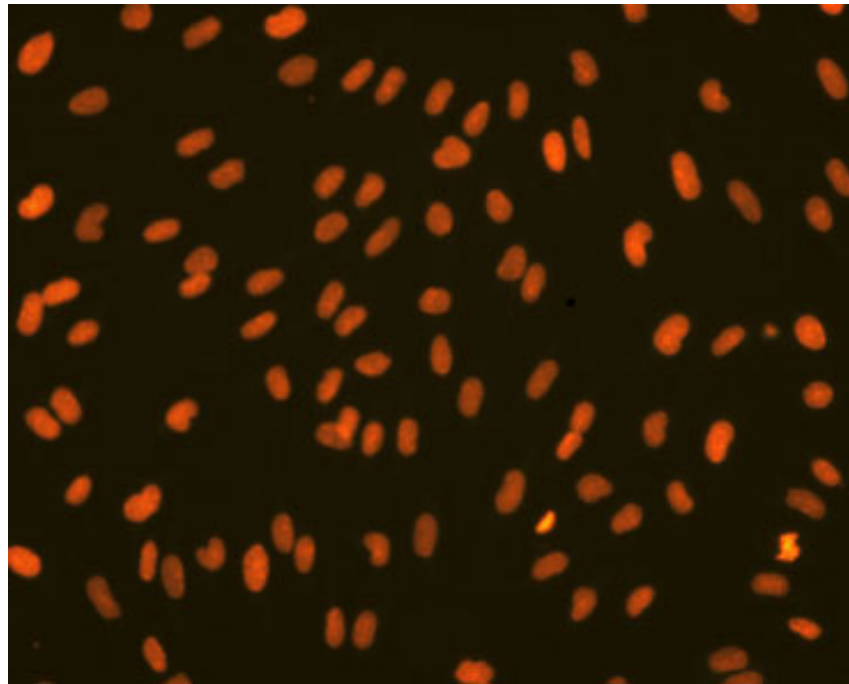


Abb. 16: Nachweis des Fehlens von α -smooth-muscle-actin in mikrovaskulären Endothelzellen (ein Positivnachweis würde eine grüne Fluoreszenz zeigen). Kernfärbung mit Propidiumjodid (rote Fluoreszenz). Vergrößerung 600fach. Eine konfluente Kultur mikrovaskulärer Endothelzellen wurde fixiert und eine Stunde mit dem ersten Antikörper (anti- α -smooth-muscle-actin, von der Maus) inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde der zweite Antikörper (biotin-conjugated-affinity-purified-anti-mouse-IgG) zugesetzt und wieder eine Stunde inkubiert. Erneut wurde gewaschen und anschließend eine Stunde mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin (Cy^2 -conjugated-streptavidin) inkubiert. Wieder folgte ein Waschschrift. Nach dem Durchführen einer Kernfärbung mit Propidiumjodid wurde ein letztes Mal gewaschen. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop.

2.1.5. Glial-fibrillary-acidic-protein (GFAP)

Astrozyten enthalten Gliafibrillen, die aus Bündeln von Intermediärfilamenten bestehen. Hauptbestandteil dieser Filamente ist das glial-fibrillary-acidic-protein.

Um eine Verunreinigung der Endothelzellkultur durch Astrozyten auszuschließen, wurde das Auftreten von GFAP untersucht.

Die Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop ergab, dass die Kultur der mikrovaskulären Endothelzellen *nicht* durch Astrozyten verunreinigt war, denn es konnten nur die mit Propidiumjodid angefärbten Zellkerne, *nicht* jedoch GFAP nachgewiesen werden (Abb. 17).

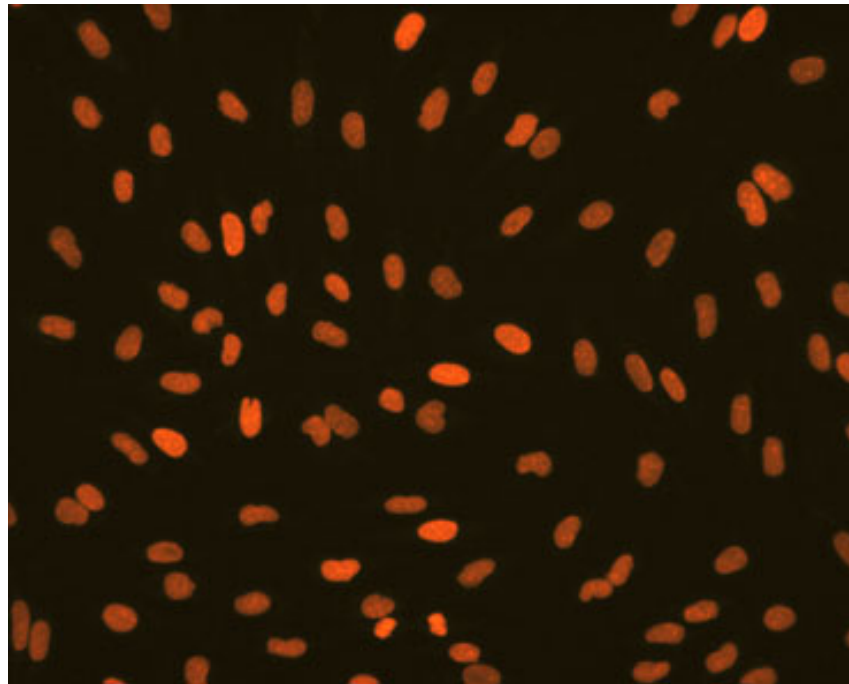


Abb. 17: Nachweis des Fehlens von GFAP in mikrovaskulären Endothelzellen (ein Positivnachweis würde eine grüne Fluoreszenz zeigen). Kernfärbung mit Propidiumjodid (rote Fluoreszenz). Vergrößerung 600fach. Der Nachweis von GFAP wurde analog zum Nachweis des von-Willebrand-Faktors bei Endothelzellen durchgeführt (s. Abb 14). Nur wurde hier als erster Antikörper rabbit-anti-cow-glial fibrillary-acidic-protein verwendet. Alle folgenden Schritte waren exakt gleich.

2.2. Charakterisierung von Astrozyten

Die Charakterisierung der Astrozyten nach ihrer Isolierung stellte sicher, dass es sich bei den Zellen tatsächlich um Astrozyten handelte. Außerdem wurde eine Verunreinigung der Zellkultur durch andere Zelltypen ausgeschlossen.

2.2.1. Morphologie

Astrozyten wiesen die typischen vom Zellkörper ausgehenden langen und verzweigten Fortsätze auf (Abb. 18).

2.2.2. Glial-fibrillary-acidic-protein (GFAP)

Wie oben beschrieben, exprimieren Astrozyten das glial-fibrillary-acidic-protein. Diese Eigenschaft wurde als Positivnachweis für Astrozyten eingesetzt.

Mit dem Fluoreszenzmikroskop konnte GFAP in fast jeder Zelle nachgewiesen werden (Abb. 19). Damit wurde das Vorliegen einer relativ reinen Astrozytenpopulation bestätigt.

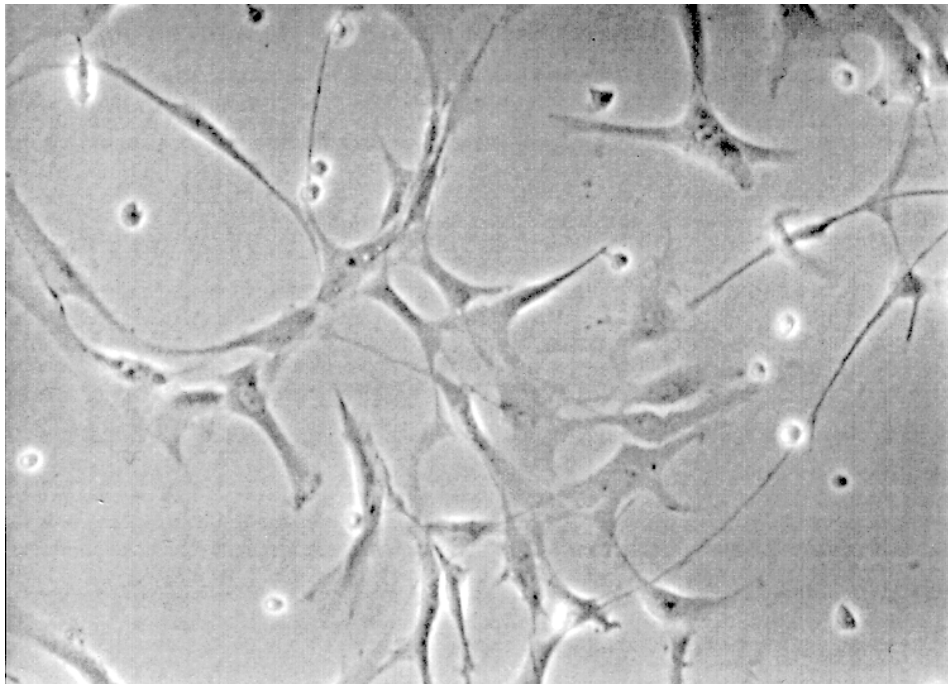


Abb. 18: Morphologie von Astrozyten. Lichtmikroskopische Aufnahme mit Phasenkontrast einer Astrozytenkultur. Vergrößerung 200fach.

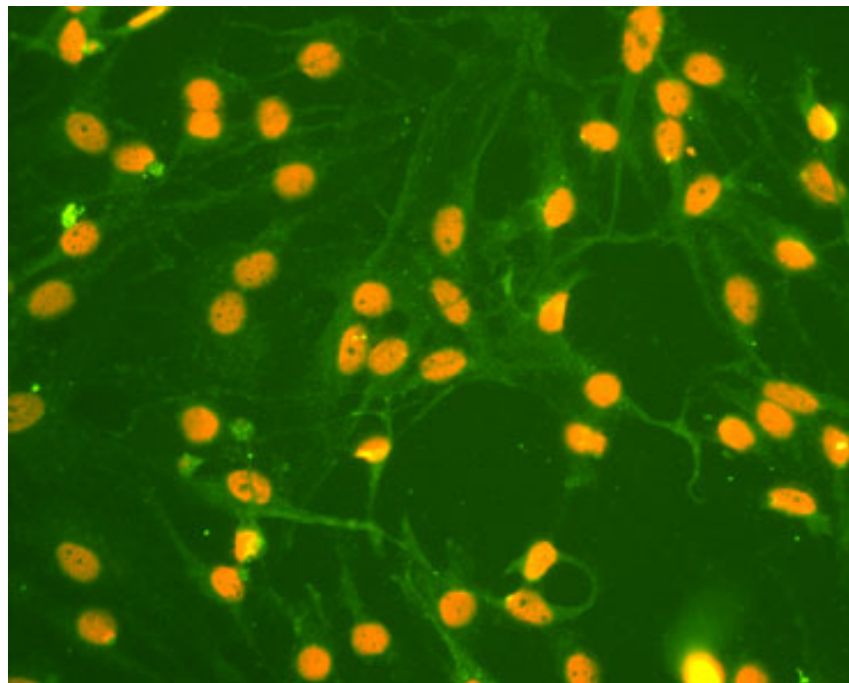


Abb. 19: Nachweis des glial-fibrillary-acidic-protein (GFAP) in Astrozyten (grüne Fluoreszenz). Kernfärbung mit Propidiumjodid (rote Fluoreszenz). Vergrößerung 600fach. Der Nachweis von GFAP wurde analog zum Nachweis des von-Willebrand-Faktors bei Endothelzellen durchgeführt (s. Abb. 14). Nur wurde hier als erster Antikörper rabbit-anti-cow-glial-fibrillary-acidic-protein verwendet. Alle folgenden Schritte waren exakt gleich.

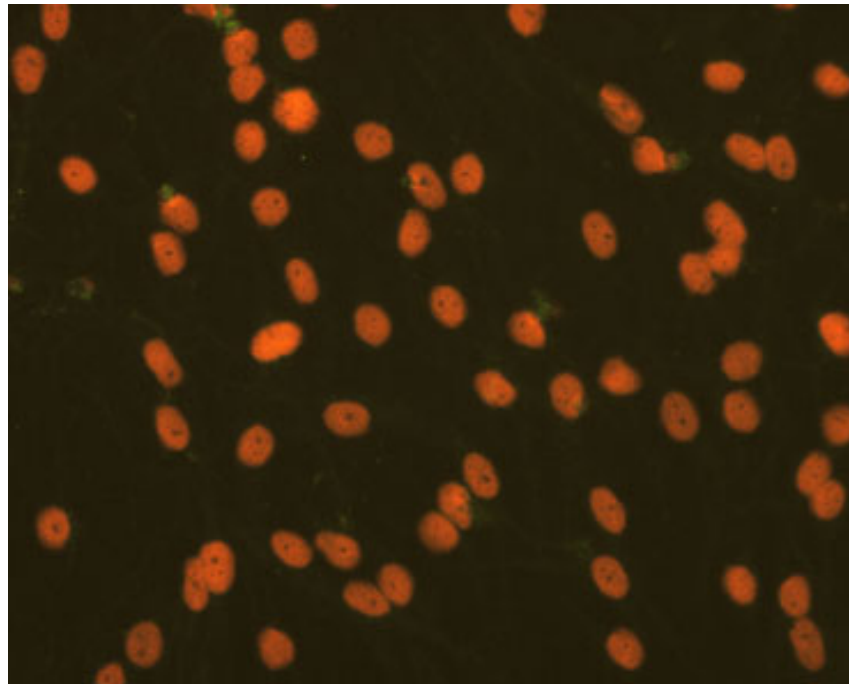


Abb. 20: Kontrolle zum Ausschluss einer Kreuzreaktion des 2. Antikörpers oder des fluoreszenzmarkierten Streptavidins mit den Zellen. Kernfärbung mit Propidiumjodid (rote Fluoreszenz). Vergrößerung 600fach. Hierbei wurden die Zellen, wie in Abb. 19 beschrieben, behandelt mit der Änderung, dass der erste Antikörper nicht zugesetzt wurde. So konnte sichergestellt werden, dass der Fluoreszenznachweis wirklich auf der Reaktion des ersten Antikörpers beruhte.

Durch Kontrollen wurde sichergestellt, dass eine Kreuzreaktion des zweiten Antikörpers oder des fluoreszenzmarkierten Streptavidins mit den Zellen nicht stattgefunden hatte.

In der Kontrolle waren ausschließlich die durch Propidiumjodid angefärbten Zellkerne sichtbar, eine Kreuzreaktion hatte daher nicht stattgefunden (Abb. 20).

2.2.3. α -smooth-muscle-actin

Das Protein α -smooth-muscle-actin wird von Astrozyten, jedoch *nicht* von Endothelzellen exprimiert.

Mit dem Fluoreszenzmikroskop konnte α -smooth-muscle-actin in fast jeder Zelle nachgewiesen werden (Abb. 21). Dies sprach gegen eine Verunreinigung der Astrozytenkultur durch Endothelzellen.

Durch Kontrollen wurde sichergestellt, dass eine Kreuzreaktion des zweiten Antikörpers oder des Cy²-conjugated-streptavidin mit den Zellen nicht stattgefunden hatte.

In der Kontrolle waren ausschließlich die durch Propidiumjodid angefärbten Zellkerne sichtbar, eine Kreuzreaktion hatte daher nicht stattgefunden (Abb. 22).

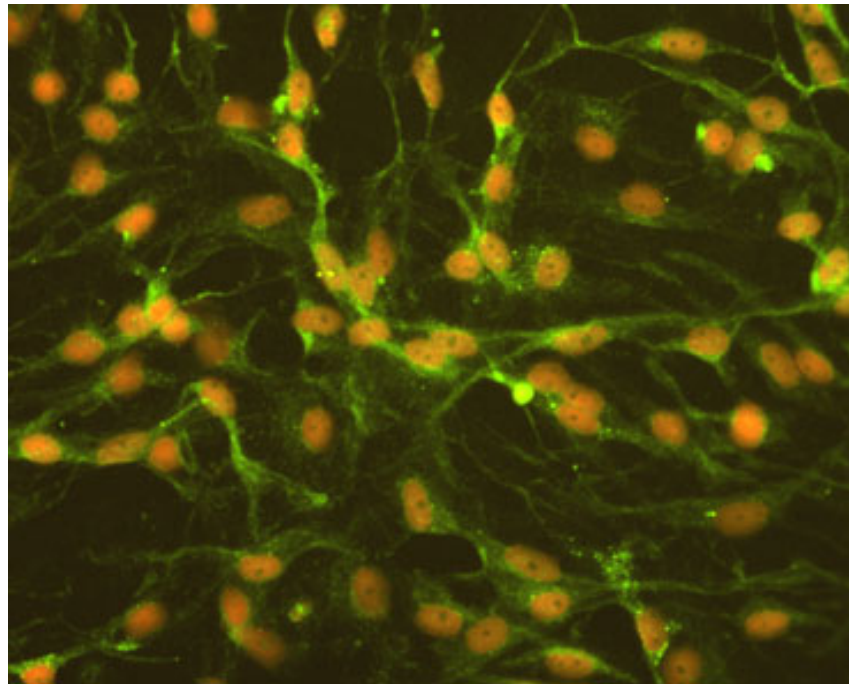


Abb. 21: Nachweis des α -smooth-muscle-actin in Astrozyten (grüne Fluoreszenz). Kernfärbung mit Propidiumjodid (rote Fluoreszenz). Vergrößerung 600fach. Der Nachweis von α -smooth-muscle-actin wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt (s. Abb. 16).

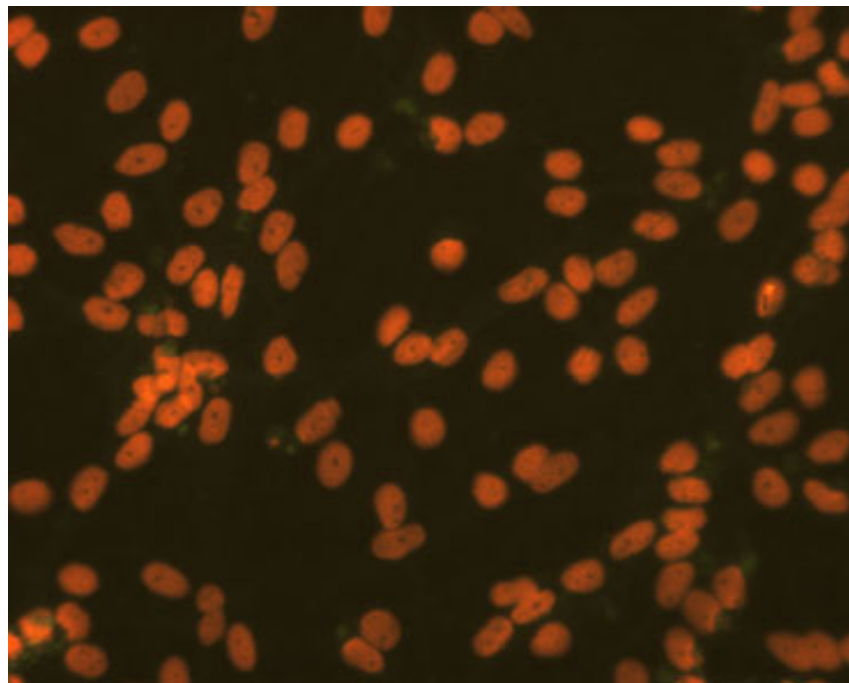


Abb. 22: Kontrolle zum Ausschluss einer Kreuzreaktion des 2. Antikörpers oder des fluoreszenzmarkierten Streptavidins mit den Zellen. Kernfärbung mit Propidiumjodid (rote Fluoreszenz). Vergrößerung 600fach. Hierbei wurden die Zellen, wie in Abb. 21 beschrieben, behandelt mit der Änderung, dass der erste Antikörper nicht zugesetzt wurde. So konnte sichergestellt werden, dass der Fluoreszenznachweis wirklich auf der Reaktion des ersten Antikörpers beruhte.

2.2.4. von-Willebrand-Faktor (vWF)

Astrozyten exprimieren den vWF im Gegensatz zu Endothelzellen *nicht*. Um eine Verunreinigung der Astrozytenkultur durch Endothelzellen auszuschließen, wurde das Auftreten des vWF untersucht.

Die Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop ergab, dass die Astrozytenzellkultur nur geringfügig mit Endothelzellen verunreinigt war, denn es konnten fast nur die mit Propidiumjodid angefärbten Zellkerne, kaum jedoch der vWF nachgewiesen werden (Abb. 23).

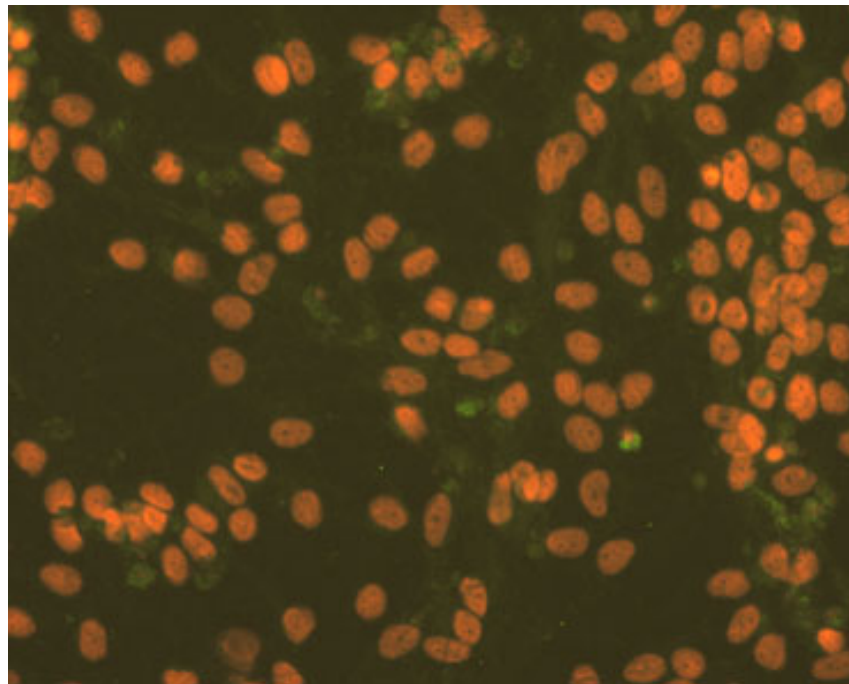


Abb. 23: Nachweis des Fehlens von vWF in Astrozyten (ein Positivnachweis würde eine grüne Fluoreszenz zeigen). Kernfärbung mit Propidiumjodid (rote Fluoreszenz). Vergrößerung 600fach. Der Nachweis des vWF wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt (s. Abb. 14).

3. Wirkung der volatilen Anästhetika auf Vitalität, Morphologie und Gesamtproteinkonzentration mikrovaskulärer Endothelzellen und auf Vitalität von Astrozyten

3.1. Zytotoxizitätstest

Mit einem Zytotoxizitätstest wurde untersucht, ob volatile Anästhetika einen schädigenden Einfluss auf mikrovaskuläre Endothelzellen oder Astrozyten haben.

Die Funktionsweise des zur Bestimmung der relativen Zahl vitaler Zellen

angewendeten CellTiter 96A_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay beruht darauf, dass nur *vitale* Zellen ein zugegebenes blassgelbes Tetrazoliumsalz intramitochondrial in ein dunkelrotes Formazanprodukt umwandeln. Die anschließend spektralphotometrisch gemessene Absorption des Formazanprodukts ist proportional zur Anzahl lebender Zellen.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der relativen Anzahl vitaler Zellen zwischen der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen, die unter normoxischen Bedingungen in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika inkubiert worden waren (Abb. 24).

Weiterhin sollte der Einfluss der volatilen Anästhetika unter hyoxischen Bedingungen untersucht werden. Auch die Zellen, die unter hypoxischer Atmosphäre in Gegenwart oder Abwesenheit eines der volatilen Anästhetika inkubiert worden waren, zeigten in Bezug auf ihre Vitalität im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Veränderung (Abb. 25).

Dies lässt darauf schließen, dass eine 6-stündige Einwirkung *keines* der untersuchten volatilen Anästhetika unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen einen letal schädigenden Einfluss auf mikrovaskuläre Endothelzellen oder Astrozyten hat.

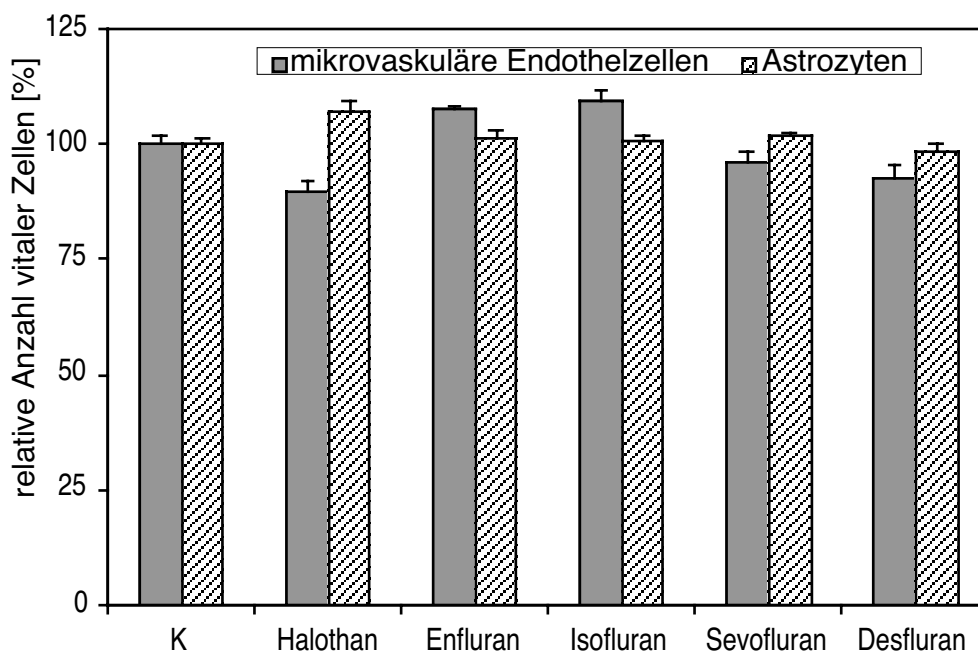


Abb. 24: Zytotoxizitätstest (Normoxie). 96-Well-Platten mit konfluenten Kulturen mikrovaskulärer Endothelzellen oder Astrozyten wurden 6 h unter normoxischen Bedingungen in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika (Konzentration 4 MAC) inkubiert. Kontrollgruppen (K) verblieben die gleiche Zeit im Brutschrank. Dann wurde mit dem CellTiter 96A_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay die relative Anzahl vitaler Zellen ermittelt und mit der Kontrollgruppe verglichen, deren relative Anzahl vitaler Zellen auf 100% gesetzt wurde. (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar; $n=3$)

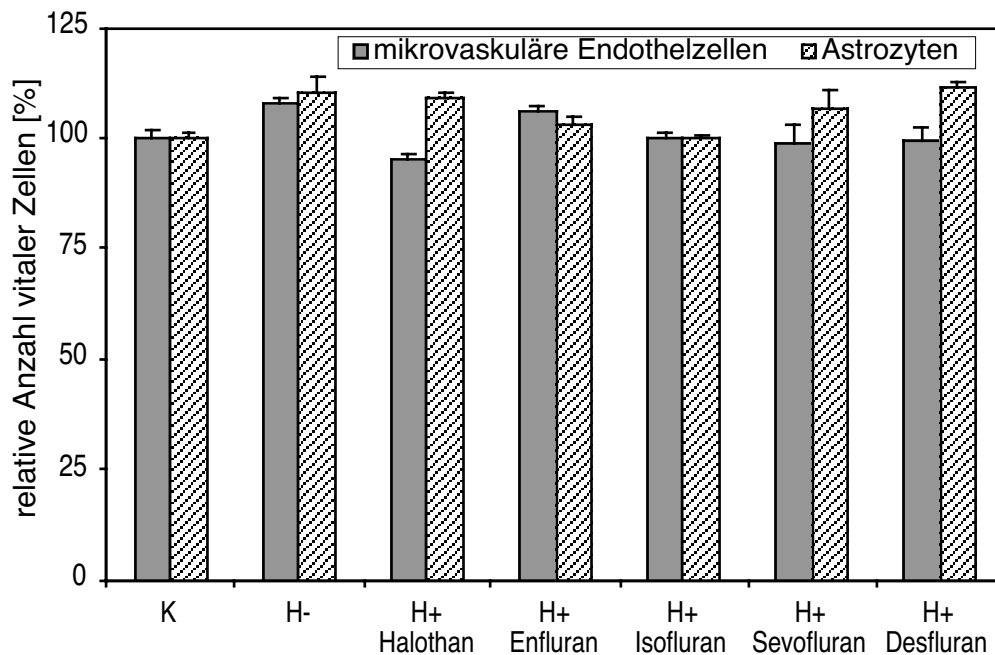


Abb. 25: Zytotoxizitätstest (Hypoxie). 96-Well-Platten mit konfluenten Kulturen mikrovaskulärer Endothelzellen oder Astrozyten wurden 6 h unter hypoxischen Bedingungen in Gegenwart (H+) oder Abwesenheit (H-) eines der volatilen Anästhetika (Konzentration 4 MAC) inkubiert. Kontrollgruppen (K) verblieben die gleiche Zeit im Brutschrank. Dann wurde mit dem CellTiter 96AQueous One Solution Cell Proliferation Assay die relative Anzahl vitaler Zellen ermittelt und mit der Kontrollgruppe verglichen, deren relative Anzahl vitaler Zellen auf 100% gesetzt wurde. (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar; n=3)

3.2. Vitalzählung

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Zytotoxizitätstests wurde an mikrovaskulären Endothelzellkulturen zusätzlich eine Vitalzählung durchgeführt.

Die Anzahl vitaler Zellen in den Versuchsgruppen, die unter normoxischer Atmosphäre in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika inkubiert worden waren, zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Veränderung (Abb. 26). Auch eine Inkubation der Zellen unter hypoxischen Bedingungen in Gegenwart oder Abwesenheit eines der volatilen Anästhetika wirkte sich nicht signifikant auf die Zellvitalität aus (Abb. 27).

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests wurden hierdurch bestätigt.

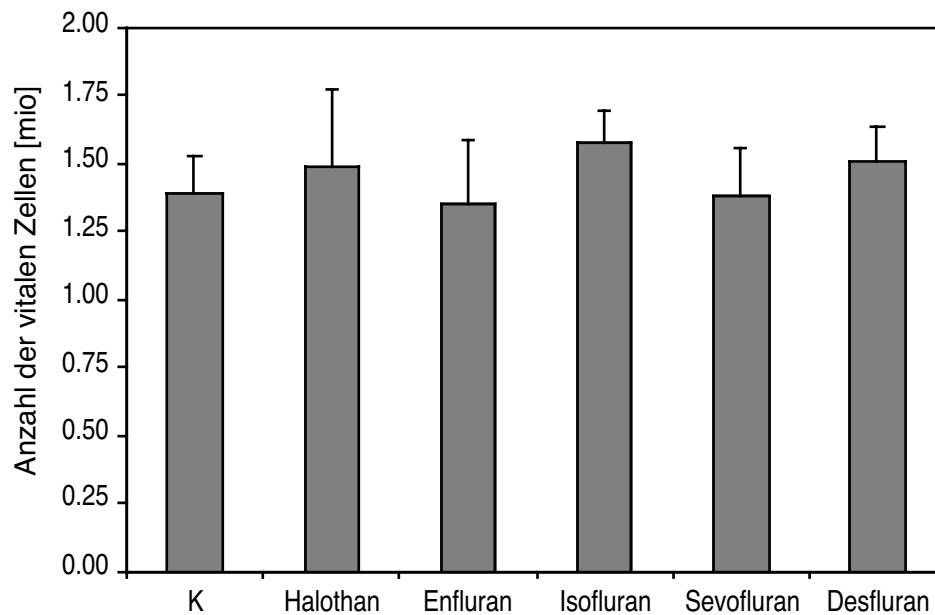


Abb. 26: Vitalzählung (Normoxie). Petrischalen mit konfluenten Kulturen mikrovaskulärer Endothelzellen wurden 6 h unter normoxischen Bedingungen in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika (Konzentration 4 MAC) inkubiert. Kontrollgruppen (K) verblieben die gleiche Zeit im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen von den Petrischalen durch Zugabe von Trypsin-EDTA abgelöst, welches dann mit FCS inaktiviert wurde. Nach einem Waschschrift wurden 100 μ l der Zellsuspension mit 100 μ l einer Trypanblaulösung vermischt. Dann wurde die Anzahl vitaler Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt. (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar; n=3)

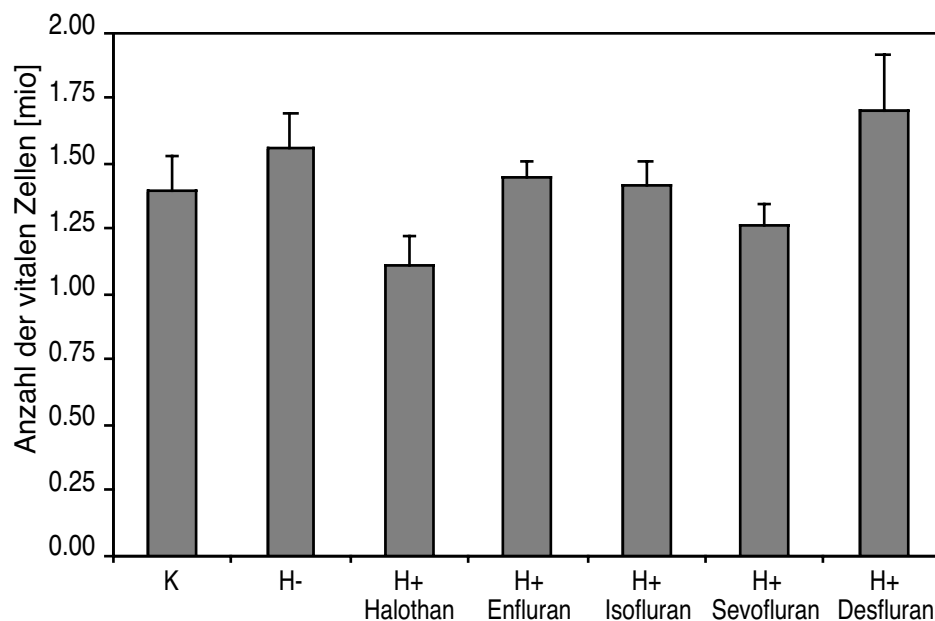


Abb. 27: Vitalzählung (Hypoxie). Petrischalen mit konfluenten Kulturen mikrovaskulärer Endothelzellen wurden 6 h unter hypoxischen Bedingungen in Gegenwart (H+) oder Abwesenheit (H-) eines der volatilen Anästhetika (Konzentration 4 MAC) inkubiert. Kontrollgruppen (K) verblieben die gleiche Zeit im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen von den Petrischalen durch Zugabe von Trypsin-EDTA abgelöst, welches dann mit FCS inaktiviert wurde. Nach einem Waschschrift wurden 100 μ l der Zellsuspension mit 100 μ l einer Trypanblaulösung vermischt. Dann wurde die Anzahl vitaler Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt. (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar; n=3)

3.3. Beurteilung der Morphologie und Bestimmung der Gesamtprotein-konzentration

Für die Untersuchung der Frage, ob volatile Anästhetika die Gesamtprotein-konzentration in mikrovaskulären Endothelzellen quantitativ beeinflussen, wurde ein Versuch, wie in Kapitel II.3.3. beschrieben, durchgeführt, bei dem konfluente Zellkulturen 6 h unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen in Gegenwart oder Abwesenheit eines der volatilen Anästhetika inkubiert waren.

Die Zellen zeigten bei der anschließenden mikroskopischen Beurteilung keine Veränderungen der Morphologie.

Nun wurde in den Zellysaten und -überständen mit dem Bio-Rad DC Protein Assay die Proteinkonzentration bestimmt. Das Verfahren beruht auf einer abgewandelten Form der Lowry Reaktion, bei der die in der Testlösung befindlichen Proteine mit Kupfertartratlösung und Folinreagenz reagieren und so zu einer Farbentwicklung führen, die photometrisch bestimmt werden kann. Die gemessene Absorption ist proportional zum Proteingehalt der Testlösung.

Wie aus Abb. 28 ersichtlich, veränderten die volatilen Anästhetika unter normoxischen Bedingungen die quantitative Gesamtproteinkonzentration in mikrovaskulären Endothelzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant. Auch eine Inkubation der Zellen unter hypoxischer Atmosphäre in Gegenwart oder Abwesenheit eines der volatilen Anästhetika wirkte sich nicht signifikant auf die Gesamtproteinkonzentration aus (Abb. 29). Ermittelt wurde die Gesamtproteinkonzentration sowohl in Zellysaten als auch in Zellüberständen.

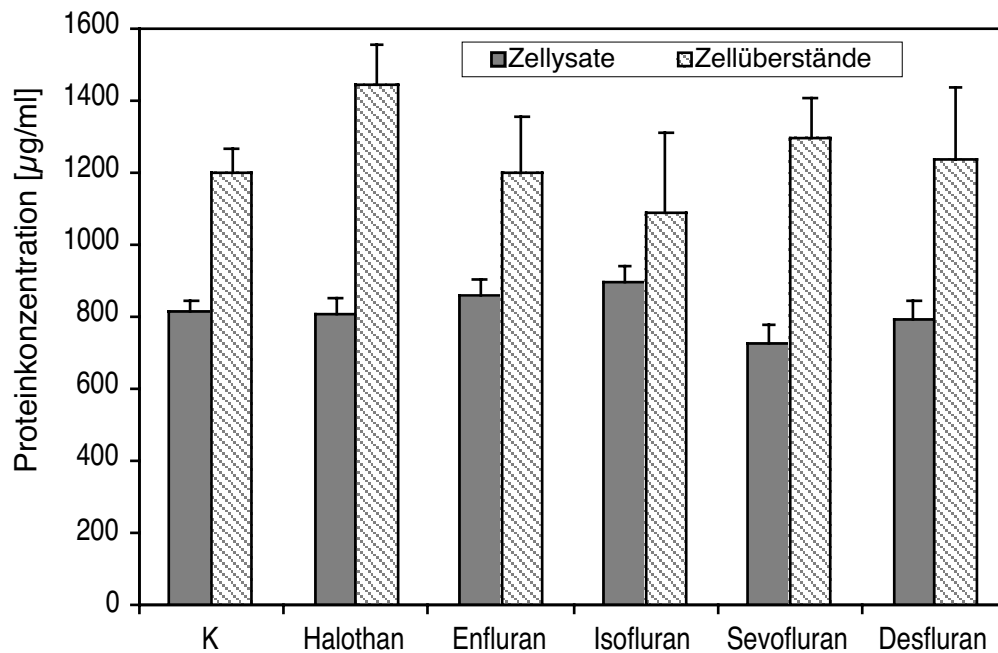


Abb. 28: Gesamte Proteinkonzentration in mikrovaskulären Endothelzellen (Normoxie). Petrischalen mit konfluenten Kulturen mikrovaskulärer Endothelzellen wurden 6 h unter normoxischer Atmosphäre in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika (Konzentration 4 MAC) inkubiert. Kontrollgruppen verblieben 6 h im Brutschrank. Die Gesamte Proteinkonzentration in den Zellysaten und -überständen wurde mit dem Bio-Rad DC Protein Assay bestimmt. (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar; $n=8$)

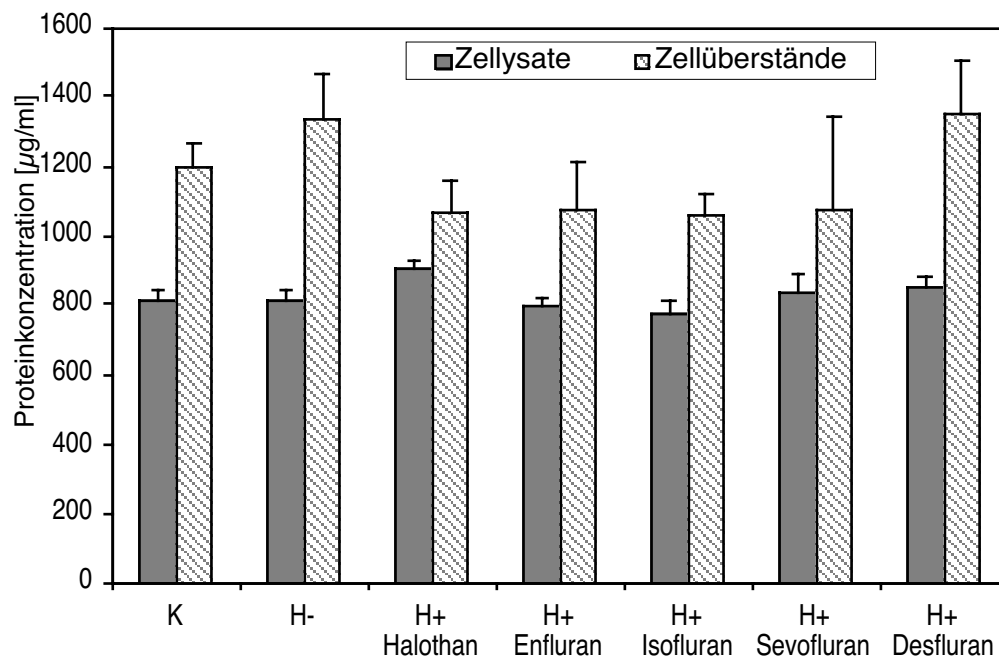


Abb. 29: Gesamte Proteinkonzentration in mikrovaskulären Endothelzellen (Hypoxie). Petrischalen mit konfluenten Kulturen mikrovaskulärer Endothelzellen wurden 6 h unter hypoxischer Atmosphäre in Gegenwart (H+) oder Abwesenheit (H-) eines der volatilen Anästhetika (Konzentration 4 MAC) inkubiert. Kontrollgruppen verblieben 6 h im Brutschrank. Die Gesamte Proteinkonzentration in den Zellysaten und -überständen wurde mit dem Bio-Rad DC Protein Assay bestimmt. (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar; $n=8$)

4. Wirkung der volatilen Anästhetika auf die Permeabilität des *in vitro* Modells der Blut-Hirn-Schranke

Wie in Kapitel II.4.1. beschrieben, bestand das *in vitro* Modell der Blut-Hirn-Schranke aus konfluenten Monolayern mikrovaskulärer Endothelzellen auf kollagenbeschichteten Filtermembran-Inserts, die in 24-Well-Platten eingesetzt wurden. Nach Zugabe eines Markers (Evans blue Albumin oder Tritium-markiertes Inulin) in das Zellkulturmedium der apikalen Kammer wurden die Zellen je nach Versuchsgruppe unter normoxischer oder hypoxischer Atmosphäre in Gegenwart oder Abwesenheit eines der volatilen Anästhetika inkubiert. Kontrollgruppen verblieben im Brutschrank. Nach 6 h wurden Proben aus der basolateralen Kammer entnommen und die Konzentration des übergetretenen Markers bestimmt. Die Höhe dieser Konzentration diente als Maß für die Höhe der Permeabilität gegenüber diesem Marker in dieser Versuchsgruppe.

Wie aus den Abb. 30 und 32 ersichtlich, war die Permeabilität der Versuchsgruppen, die unter normoxischer Atmosphäre in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika inkubiert worden waren, im Vergleich zur Permeabilität der Kontrollgruppe nicht signifikant verändert. Dies wurde sowohl für den Marker EBA als auch für [³H]-Inulin gezeigt.

Aufgrund der Reduktion einer durch Hypoxie induzierten Hyperpermeabilität der *in vitro* BHS durch die intravenösen Anästhetika Thiopental und Methohexital (s. Kapitel I.3., I.4.) sollten weiterhin Permeabilitätsversuche mit volatilen Anästhetika unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt werden.

Hypoxie führte zu einer signifikanten Permeabilitätserhöhung gegenüber normoxischen Kontrollgruppen. Allerdings wurde diese Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität durch die Gegenwart keines der volatilen Anästhetika beeinflusst (Abb. 31,33).

Auch diese Ergebnisse stimmten für EBA und [³H]-Inulin überein.

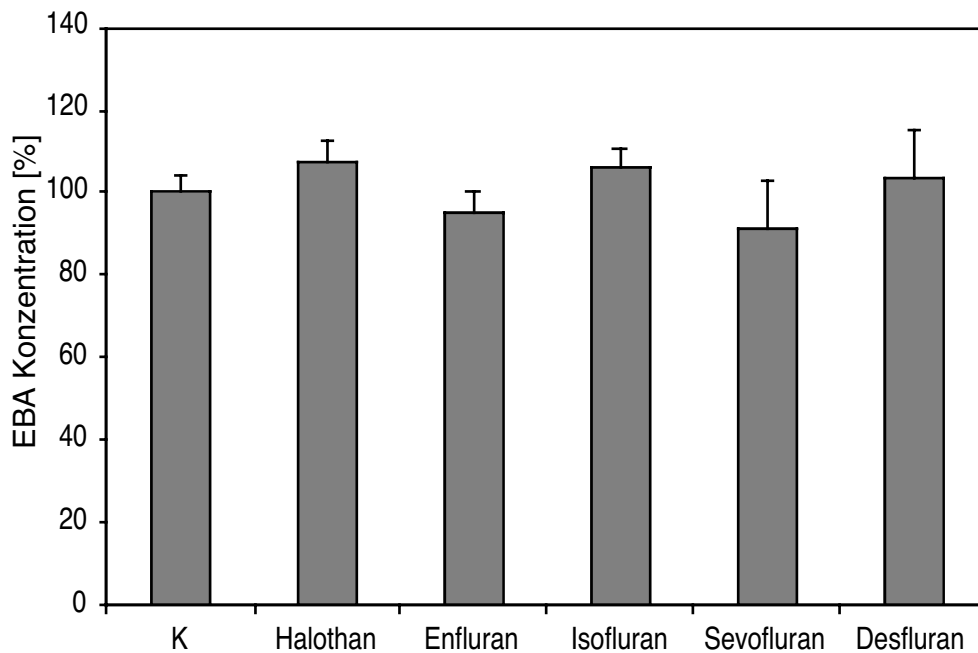


Abb. 30: Messung der Permeabilität des Endothelzellmonolayers gegenüber EBA unter 6-stündiger normoxischer Atmosphäre in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika (Konzentration 4 MAC). Kontrollgruppen (K) verblieben 6 h im Brutschrank. Der Mittelwert der Kontrollgruppe wurde auf 100% gesetzt. (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar; $n=7$)

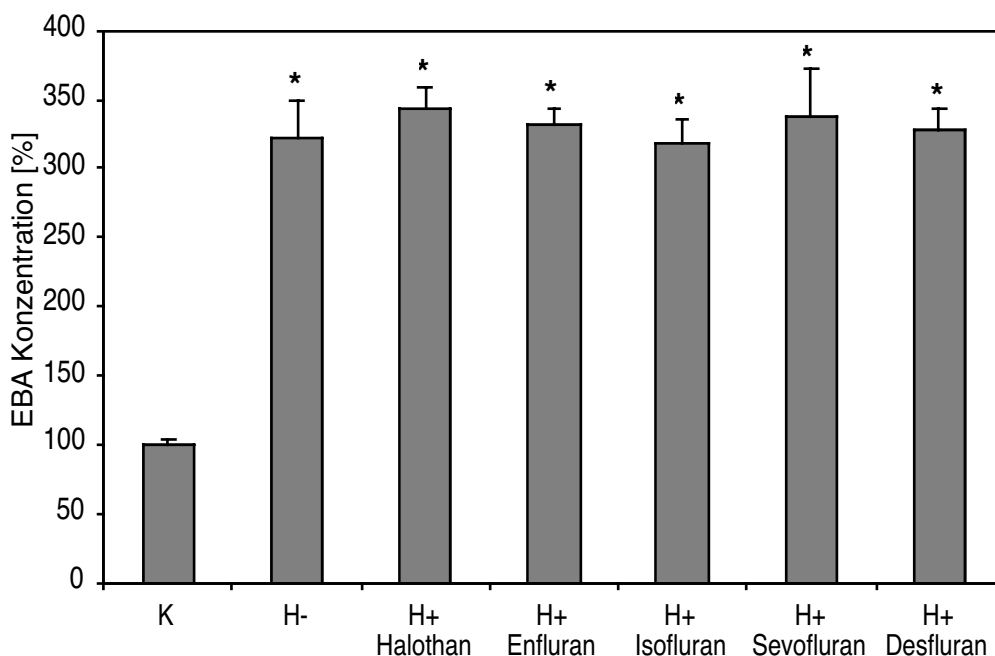


Abb. 31: Messung der Permeabilität des Endothelzellmonolayers gegenüber EBA unter 6-stündiger hypoxischer Atmosphäre in Gegenwart (H+) oder Abwesenheit (H-) eines der volatilen Anästhetika (Konzentration 4 MAC). Kontrollgruppen (K) verblieben 6 h im Brutschrank. Der Mittelwert der Kontrollgruppe wurde auf 100% gesetzt. (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar; $n=6$; * $p < 0,05$ bezüglich der Kontrollgruppe)

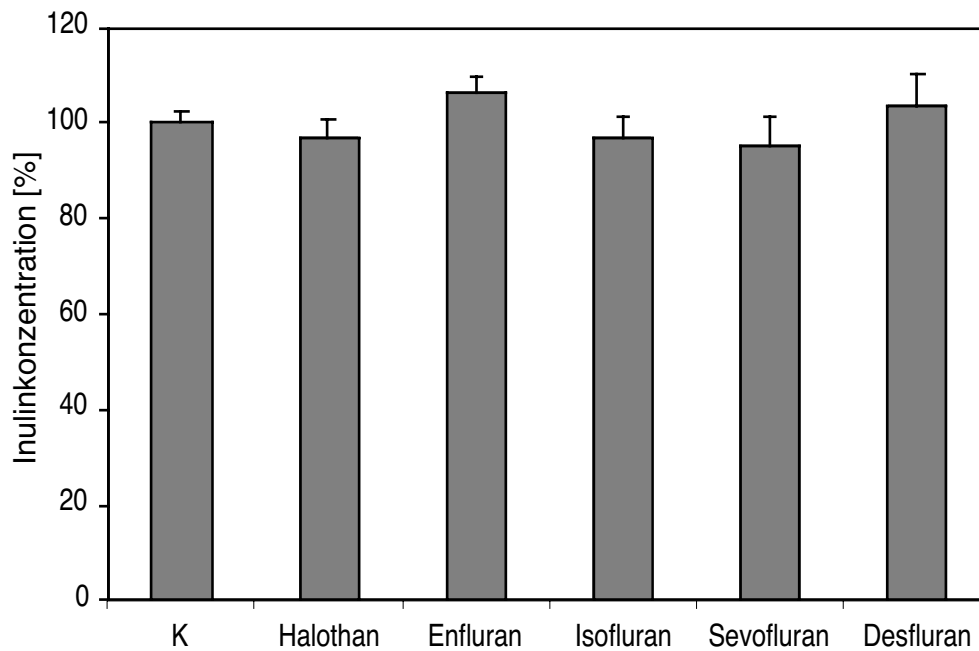


Abb. 32: Messung der Permeabilität des Endothelzellmonolayers gegenüber [^3H]-Inulin unter 6-stündiger normoxischer Atmosphäre in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika (Konzentration 4 MAC). Kontrollgruppen (K) verblieben 6 h im Brutschrank. Der Mittelwert der Kontrollgruppe wurde auf 100% gesetzt. (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar; $n=4$)

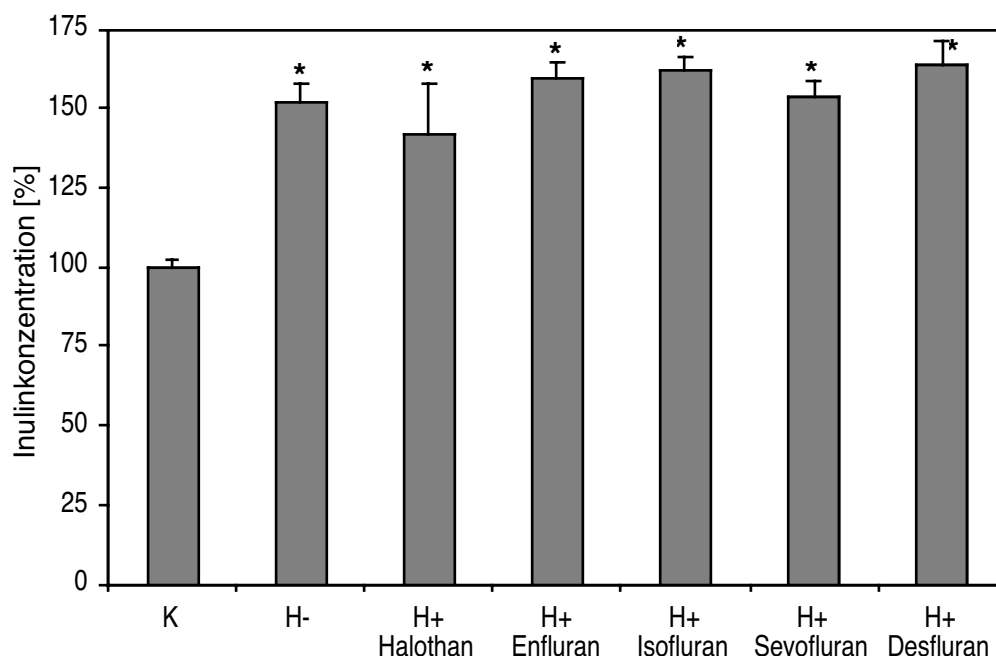


Abb. 33: Messung der Permeabilität des Endothelzellmonolayers gegenüber [^3H]-Inulin unter 6-stündiger hypoxischer Atmosphäre in Gegenwart (H^+) oder Abwesenheit (H^-) eines der volatilen Anästhetika (Konzentration 4 MAC). Kontrollgruppen (K) verblieben 6 h im Brutschrank. Der Mittelwert der Kontrollgruppe wurde auf 100% gesetzt. (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar; $n=4$; * $p < 0,05$ bezüglich der Kontrollgruppe)

Kontrollversuche zeigten, dass die Passage von EBA oder [³H]-Inulin über kollagenbeschichtete Filtermembran-Inserts *ohne* Endothelzellmonolayer unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen in Gegenwart oder Abwesenheit eines der volatilen Anästhetika gleich war.

Die Permeabilität des Endothelzellmonolayers gegenüber EBA oder [³H]-Inulin der Kontrollgruppe im Brutschrank entsprach der einer Versuchsgruppe im Kammersystem unter normoxischen Bedingungen in Abwesenheit eines der volatilen Anästhetika.

5. Wirkung der volatilen Anästhetika auf die VEGF-Expression in mikrovaskulären Endothelzellen

In den nachfolgenden Experimenten wurde der Einfluss volatiler Anästhetika auf die Expression des vascular endothelial growth factor (VEGF) in mikrovaskulären Endothelzellen untersucht. Es wurde wie folgt vorgegangen:

Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden auf Petrischalen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Nun wurden die Petrischalen gewaschen und mit serumfreiem Medium (BMEC-Medium ohne FCS) befüllt. Es folgte die 6-stündige Inkubation der Zellen im Kammersystem unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen in Gegenwart oder Abwesenheit eines der volatilen Anästhetika. Kontrollkulturen wurden 6 h im Brutschrank inkubiert. Nach anschließender Entnahme der Kulturschalen wurden die Zellkulturüberstände in Falconröhrchen transferiert und zur Proteinstabilisierung mit PMSF versetzt. Später wurden sie im Gefriertrockner getrocknet, um die Proteinkonzentration zu erhöhen. Die Zellen auf den Petrischalen wurden mit Guanidiniumthiocyanatpuffer (wenn anschließend ein Northern-Blot durchgeführt werden sollte) bzw. mit Lysispuffer (wenn anschließend Western-Blots oder ELISAs durchgeführt werden sollten) abgeschabt und in Eppendorfgefäße transferiert.

5.1. Northern-Blot-Analyse

Es ist bekannt, dass die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität der *in vitro* Blut-Hirn-Schranke über autokrine VEGF Ausschüttung vermittelt wird. Um die Ergebnisse der Permeabilitätsversuche zu bestätigen, wurde daher die VEGF mRNA-Expression in mikrovaskulären Endothelzellen unter dem Einfluss volatiler Anästhetika mit Northern-Blots untersucht.

Im Northern-Blot der Zellysate konnten eine größere (3,9 kB) und eine kleinere (1,7 kB) Form der VEGF mRNA nachgewiesen werden (Abb. 34).

Die quantitative VEGF mRNA-Expression in mikrovaskulären Endothelzellkulturen, die 6 h unter normoxischen Bedingungen in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika inkubiert worden waren, unterschied sich nicht signifikant von der in Kontrollkulturen, die 6 h im Brutschrank verblieben waren (Abb. 35). Die 6-stündige Inkubation unter hypoxischen Bedingungen in Gegenwart oder Abwesenheit eines der volatilen Anästhetika führte im Vergleich zur Kontrollgruppe, die 6 h im Brutschrank verblieben war, zu einer signifikanten Steigerung der VEGF mRNA-Expression, etwa um den Faktor 1,6 (Abb. 36). Allerdings zeigte sich bei den Versuchen unter hypoxischen Bedingungen kein quantitativer Unterschied der VEGF mRNA-Expression in Endothelzellkulturen, die in Gegenwart und solchen, die in Abwesenheit eines der volatilen Anästhetika inkubiert worden waren.

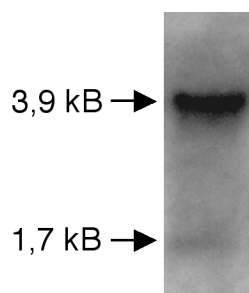


Abb. 34: Nachweis der VEGF mRNA im Northern-Blot.

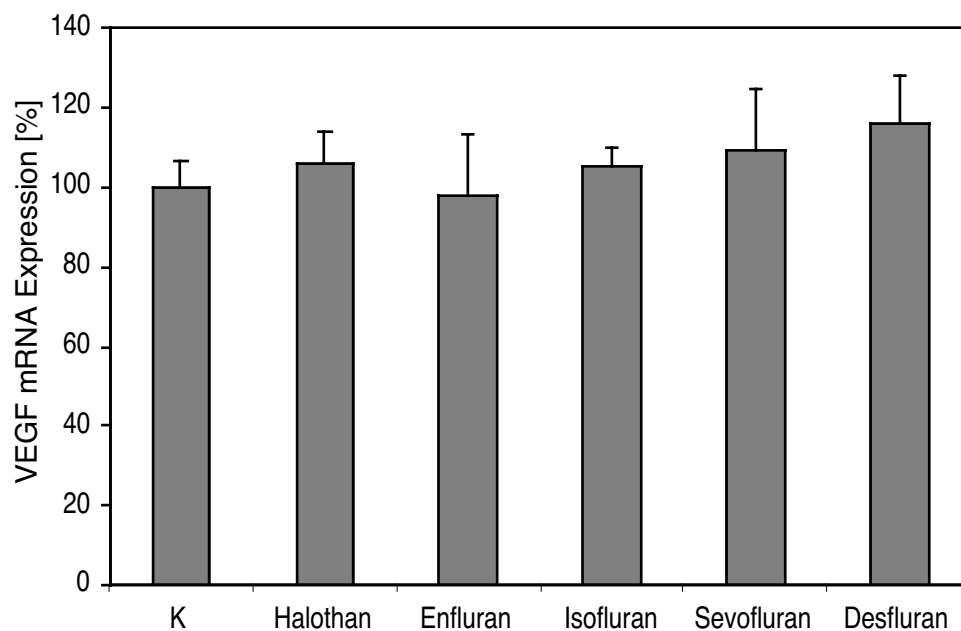


Abb. 35: Northern-Blot-Analyse (Normoxie). Nachweis der VEGF mRNA-Expression in mikrovaskulären Endothelzellen nach 6-stündiger Inkubation unter normoxischer Atmosphäre in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika (Konzentration 4 MAC). Kontrollgruppen (K) verblieben 6 h im Brutschrank. Der Mittelwert der Kontrollgruppe wurde auf 100% gesetzt. (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar; $n=4$)

Es wurden Versuche, wie in Kapitel II.5.2. beschrieben, durchgeführt. Die Gesamt-RNA in Zellysaten wurde aufbereitet, in einem Formaldehyd-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Nach Hybridisierung der VEGF mRNA mit radioaktiv markierten VEGF cDNA-Sonden wurde ein Phosphorscreen gegen die Membran exponiert und anschließend mit einem Phosphorimager ausgewertet. Alle Werte wurden bezüglich der 18S rRNA-Expression korrigiert.

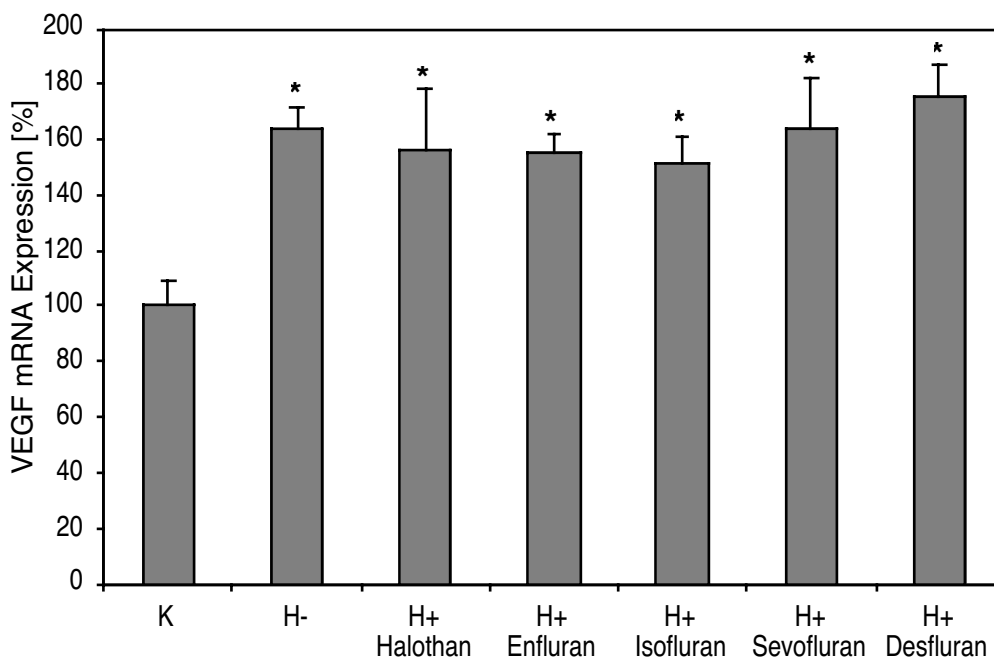


Abb. 36: Northern-Blot-Analyse (Hypoxie). Nachweis der VEGF mRNA-Expression in mikrovaskulären Endothelzellen nach 6-stündiger Inkubation unter hypoxischer Atmosphäre in Gegenwart (H+) oder Abwesenheit (H-) eines der volatilen Anästhetika (Konzentration 4 MAC). Kontrollgruppen (K) verblieben 6 h im Brutschrank. Der Mittelwert der Kontrollgruppe wurde auf 100% gesetzt. (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar; $n=3$; * $p<0,05$ bezüglich der Kontrollgruppe) Die Durchführung des Northern-Blots erfolgte, wie in Abb. 35 beschrieben.

5.2. Western-Blot-Analyse

Da bekannt ist, dass die mRNA-Expression quantitativ nicht unbedingt mit der Expression des entsprechenden Proteins übereinstimmen muss, wurden zur Bestätigung der Northern-Blot-Analysen zusätzlich Versuche zur Bestimmung der VEGF-Proteinexpression in mikrovaskulären Endothelzellen unter dem Einfluss volatiler Anästhetika durchgeführt.

Dazu wurden Versuche, wie in Kapitel II.5.3. beschrieben, durchgeführt. Nun wurde mit Western-Blots die Expression des VEGF in den Zellysaten nachgewiesen. In Zellüberständen war die Konzentration des VEGF zu gering, als dass sie mit Western-Blots hätte detektiert werden können.

Im Western-Blot der Zellysate konnte VEGF als Doppelbande bei 22 kD (glykolisierte und nicht-glykolisierte VEGF₁₆₅ Isoform) und als schwache Bande bei 16 kD (VEGF₁₂₁ Isoform) nachgewiesen werden.

In mikrovaskulären Endothelzellkulturen, die 6 h unter normoxischer Atmosphäre in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika inkubiert worden waren, ließ sich im Vergleich zu Kontrollkulturen, die 6 h im Brutschrank verblieben waren, kein

Unterschied in der VEGF-Expression nachweisen, da die Intensität der VEGF-Banden gleich war (Abb. 37). Kulturen mikrovaskulärer Endothelzellen, die 6 h unter hypoxischer Atmosphäre in Gegenwart oder Abwesenheit eines der volatilen Anästhetika inkubiert worden waren, zeigten im Vergleich zu Kontrollkulturen, die 6 h im Brutschrank verblieben waren, eine höhere Intensität der VEGF-Banden und damit eine höhere Expression des VEGF (Abb. 38). Allerdings unterschied sich die VEGF-Expression in Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika inkubiert worden waren, *nicht* von der in Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen ohne eines der volatilen Anästhetika inkubiert worden waren.

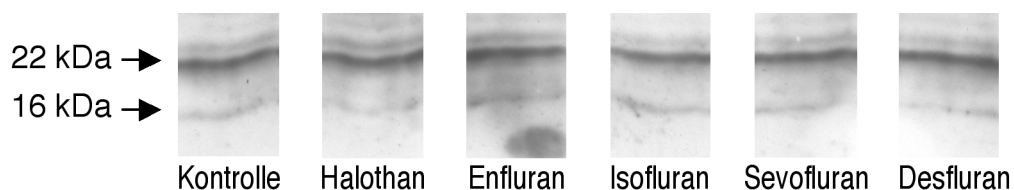


Abb. 37: Western-Blot-Analyse (Normoxie). Nachweis der VEGF-Expression in mikrovaskulären Endothelzellen nach 6-stündiger Inkubation unter normoxischer Atmosphäre in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika (Konzentration 4 MAC). Kontrollgruppen verblieben 6 h im Brutschrank.

Die Proteine der Zellysate wurden elektrophoretisch in einem SDS-Acrylamid-Gel aufgetrennt und mit einer Semi-Dry-Blot-Vorrichtung auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die anschließende Immundetektion des VEGF erfolgte mit rabbit-anti-human-VEGF als 1. Antikörper. Der zweite Antikörper (Biotin-SP-konjugierter affinitätsgereinigter anti-rabbit-IgG), an den ein Biotin-Rest gekoppelt war, band an den ersten Antikörper. Der Streptavidin-Rest des nun zugesetzten StreptABComplex/HRP band an den Biotin-Rest des zweiten Antikörpers; der HRP-Rest (=horseradish peroxidase) katalysierte beim nachfolgend eingesetzten ECL-Kit eine Reaktion, bei der Licht entstand. Ein gegen die Membran exponierter lichtempfindlicher Film stellte nach seiner Entwicklung detektiertes VEGF als schwarze Banden dar.

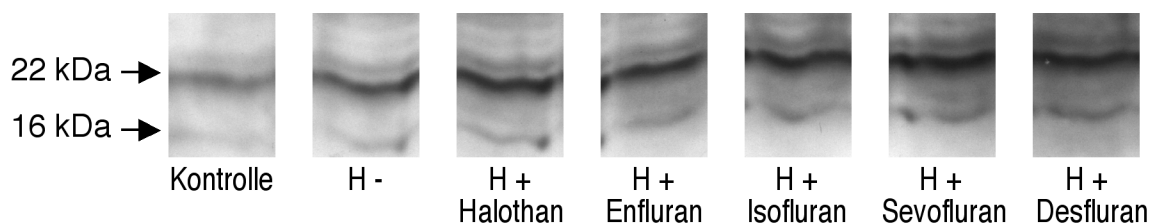


Abb. 38: Western-Blot-Analyse (Hypoxie). Nachweis der VEGF-Expression in mikrovaskulären Endothelzellen nach 6-stündiger Inkubation unter hypoxischer Atmosphäre in Gegenwart (H+) oder Abwesenheit (H-) eines der volatilen Anästhetika (Konzentration 4 MAC). Kontrollgruppen verblieben 6 h im Brutschrank. Die Durchführung des Western-Blots erfolgte, wie in Abb. 37 beschrieben.

5.3. Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)

Zur Untersuchung der quantitativen VEGF-Expression in mikrovaskulären Endothelzellen unter dem Einfluss volatiler Anästhetika wurden ELISAs eingesetzt. Dazu wurden Versuche, wie in Kapitel II.5.4. beschrieben, durchgeführt.

In mikrovaskulären Endothelzellkulturen, die 6 h unter normoxischer Atmosphäre in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika inkubiert worden waren, ließ sich im Vergleich zu Kontrollkulturen, die 6 h im Brutschrank verblieben waren, kein signifikanter Unterschied in der quantitativen VEGF-Expression nachweisen (Abb. 39).

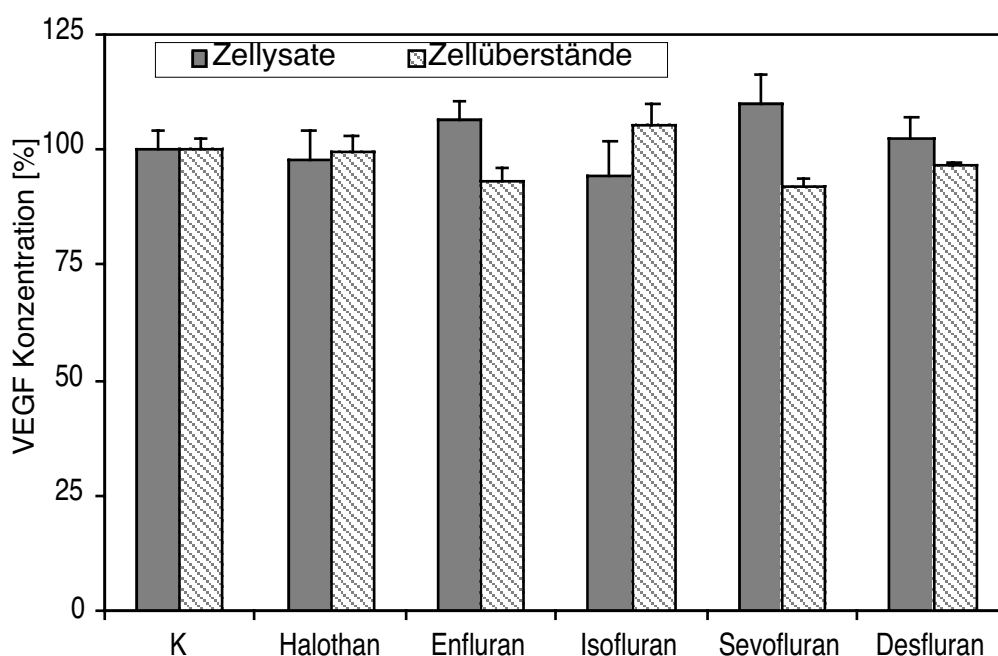


Abb. 39: ELISA (Normoxie). Quantitative Analyse der VEGF-Expression in mikrovaskulären Endothelzellen nach 6-stündiger Inkubation unter normoxischen Bedingungen in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika (Konzentration 4 MAC). Kontrollgruppen (K) verblieben für die gleiche Zeit im Brutschrank. Der Mittelwert der Kontrollgruppe wurde auf 100% gesetzt. (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar; $n=5$)

Eine 96-Well-Mikrotiterplatte, die mit anti-human VEGF Antikörpern vorbeschichtet war, band freies VEGF der zugegebenen Probe (Zellysate oder Zellüberstände). Zur Probe wurde ein biotinylierter anti-human VEGF Antikörper (vom Kaninchen) gegeben, der ebenfalls an freies VEGF band. Nun wurde Streptavidin konjugierte Alkaline Phosphatase zugegeben, die eine Bindung mit dem Biotin-Rest des zuvor benutzten Antikörpers einging und deren Phosphatase-Rest bei der anschließend zugegebenen Farbreagenzlösung eine Reaktion katalysierte, bei der ein dunkelrotes Formazanprodukt mit Absorptionsmaximum bei 492 nm entstand. Mit einem 96-Well-Plattenlesegerät konnte nun photometrisch die Absorption der einzelnen Wells bestimmt werden, die proportional zur Menge des in der Probe enthaltenen VEGF war.

Mikrovaskuläre Endothelzellkulturen, die 6 h unter hypoxischer Atmosphäre in Gegenwart oder Abwesenheit eines der volatilen Anästhetika inkubiert worden waren, zeigten im Vergleich zu Kontrollkulturen, die 6 h im Brutschrank verblieben waren, eine signifikant höhere Expression des VEGF (Abb. 40). Allerdings unterschied sich die quantitative VEGF-Expression in Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika inkubiert worden waren, *nicht* signifikant von der in Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen ohne ein volatiles Anästhetikum inkubiert worden waren.

Ermittelt wurde die VEGF-Konzentration jeweils in Zellysaten und Zellüberständen mikrovaskulärer Gehirndothelzellen.

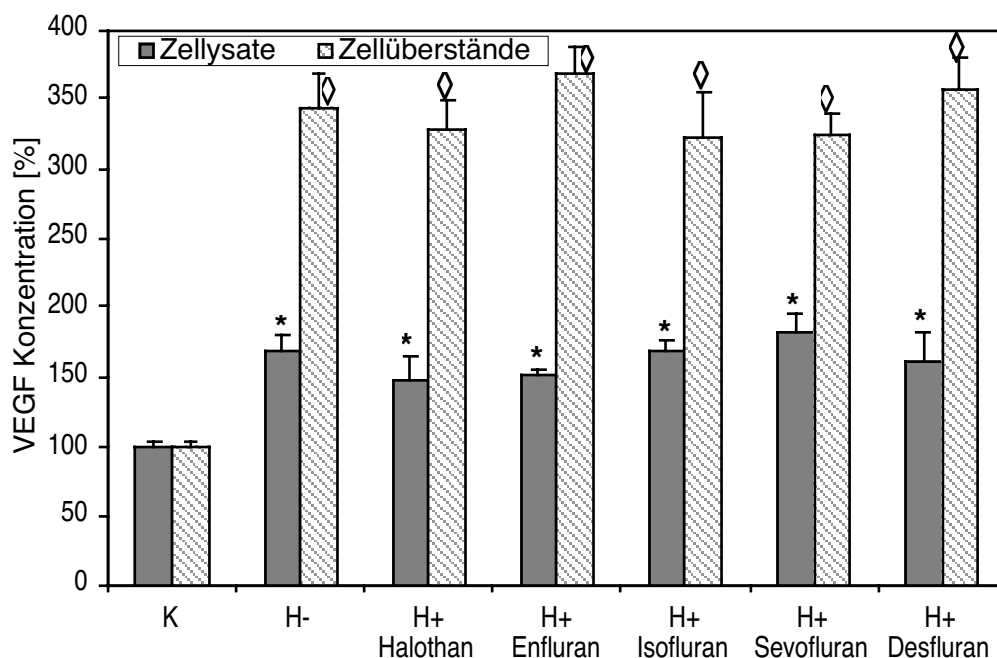


Abb. 40: ELISA (Hypoxie). Quantitative Analyse der VEGF-Expression in mikrovaskulären Endothelzellen nach 6-stündiger Inkubation unter hypoxischen Bedingungen in Gegenwart (H+) oder Abwesenheit (H-) eines der volatilen Anästhetika (Konzentration 4 MAC). Kontrollgruppen (K) verblieben für die gleiche Zeit im Brutschrank. Der Mittelwert der Kontrollgruppe wurde auf 100% gesetzt. (Die Werte stellen die Mittelwerte \pm SEM dar; $n=5$; * / ◇ $p<0,05$ bezüglich der entsprechenden Kontrollgruppe) Die Durchführung des ELISAs erfolgte, wie in Abb. 39 beschrieben.

IV. Diskussion

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) dient der Aufrechterhaltung der Homöostase des Gehirns und schützt es vor vielen im Blutkreislauf zirkulierenden potentiell toxischen Substanzen und pathogenen Keimen. Dies wird durch die präzise Kontrolle des Stoffaustauschs zwischen Blut und Gehirn erreicht. Die cerebralen Kapillaren, die hauptsächlich das morphologische Korrelat der BHS darstellen, verhindern durch ihre extreme Undurchlässigkeit die Passage der meisten Stoffe aus dem Blut ins Gehirn^{17-19,21-23}. Gelingt die Passage z.B. bei stark lipophilen Substanzen doch, so werden einige dieser Stoffe durch membranständige Enzyme der Endothelzellen inaktiviert^{26,27} oder sogar durch Transportmechanismen wieder ins Kapillarlumen zurückbefördert²⁸. Die Versorgung des Hirngewebes mit nutritiven und anderen essentiellen Substanzen wird durch Transportmechanismen gewährleistet²⁹⁻³³.

Pathologische Bedingungen wie cerebrale Hypoxie können zur Dysfunktion des Kapillarendothels führen⁵¹⁻⁵⁷. Durch den Zusammenbruch der BHS kommt es dann zu einer Hyperpermeabilität der Gehirnkapillaren, die in einem übermäßigen Flüssigkeitsausstrom aus dem Blut ins Hirngewebe resultiert. Es entsteht ein vasogenes Hirnödem, das das Gehirn zusätzlich schädigt^{44,53,54,60-66}.

Die als intravenöse Anästhetika eingesetzten Barbiturate Thiopental und Methohexital besitzen *in vivo* unter hypoxischen Bedingungen eine neuroprotektive Wirkung, die unter anderem durch die Verminderung der Ausprägung eines vasogenen Ödems zu erklären ist^{55,80-84}. Fischer et al. konnten an der aus cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen bestehenden *in vitro* BHS zeigen, dass diese Wirkung der Barbiturate unter anderem durch die Reduktion der durch die Hypoxie induzierten Hyperpermeabilität zustande kommt und damit auf eine direkte Wirkung an den Endothelzellen zurückzuführen ist. Das Verhindern des Zusammenbruchs der BHS bedingt eine Reduktion des Flüssigkeitseinstroms ins Hirngewebe und damit des vasogenen Ödems⁸⁵⁻⁸⁷.

Die Ergebnisse mit den intravenösen Anästhetika Thiopental und Methohexital führten zu der Überlegung, auch den Einfluss der volatilen Anästhetika Halothan, Enfluran, Isofluran, Sevofluran und Desfluran auf die Permeabilität eines *in vitro* Modells der BHS zu untersuchen, denn bislang ist nur wenig über deren Wirkung auf Funktionen der BHS bekannt. Es sollten dabei Versuche mit den volatilen Anästhetika sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt werden. Dies wurde in dieser Arbeit umgesetzt.

1. Konstanz und Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen

In einem speziell entwickelten Kammersystem konnten die Zellen unter einer normoxischen oder hypoxischen Atmosphäre inkubiert werden, die zusätzlich eines der volatilen Anästhetika enthielt. Dabei sollten die Gaskonzentrationen von Sauerstoff, Kohlendioxid und Narkosegas sowie die Temperatur und Luftfeuchtigkeit während der gesamten Versuchsdauer auf einem definierten Sollwert konstant gehalten werden. Durch mehrfache Messungen jedes einzelnen Parameters wurde eine Kontrolle darüber gewährleistet.

Die Auswertungen zeigen, dass das Einstellen der Gaskonzentrationen, der Temperatur und Luftfeuchtigkeit zu Beginn des Versuchs nur etwa 10 Minuten dauerte und dass die jeweiligen Werte während der Versuchszeit nur minimal von ihrem Ausgangswert abwichen.

Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen während des Versuch unter recht konstanten Bedingungen inkubiert waren und dass die Versuchsbedingungen zudem recht exakt reproduzierbar waren. Das Kammersystem eignete sich daher für die Durchführung dieser Experimente sehr gut.

Vor allem das rasche Erreichen der Sollwerte der Gaskonzentrationen zu Beginn des Experiments sowie die Möglichkeit zur genauen Einstellung der Werte durch manuelle Mischung der Gase bietet Vorteile gegenüber kommerziellen Kammersystemen. Das GasPak Plus System (Fa. BD, Heidelberg) beispielsweise entwickelt eine hypoxische Atmosphäre durch eine chemische Reaktion, bei der Wasserstoff und Kohlendioxid entsteht. Es dauert jedoch 3 h, bis der Sauerstoffgehalt in der Kammer von 21% auf 5% gesunken ist; dies ist zu lang für Versuche, deren Dauer nur einige Stunden beträgt. Außerdem beträgt der Kohlendioxidgehalt nach 3 h bis zu 10%, obwohl er, wie im Brutschrank, in dem sich die Kontrollgruppen befinden, nur 5% betragen sollte.

2. Charakterisierung der Zellen

Nach der Isolierung von mikrovaskulären Endothelzellen und Astrozyten wurden die Zellen durch den Nachweis spezifischer Charakteristika eindeutig identifiziert und eine Verunreinigung der Kultur durch andere Zelltypen ausgeschlossen.

Die mikrovaskulären Endothelzellen konnten aufgrund ihrer spindelförmigen Morphologie, die auch als „fibroblastenähnlich“ beschrieben wird, der Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem LDL und dem Expressieren des von-Willebrand-Faktors eindeutig identifiziert werden. Da die Proteine α -smooth-muscle-actin und glial-

fibrillary-acidic-protein nicht nachgewiesen werden konnten, konnte eine Verunreinigung der Zellkultur durch Perizyten/glatte Muskelzellen bzw. Astrozyten ausgeschlossen werden.

Die Charakterisierung der Astrozyten erfolgte durch lichtmikroskopischen Nachweis der typischen, vom Zellkörper ausgehenden langen und verzweigten Fortsätze, und durch den immunhistochemischen Nachweis der Expression des glial-fibrillary-acidic-protein. Eine Verunreinigung der Zellkultur durch Endothelzellen konnte weitgehend ausgeschlossen werden, da der von-Willebrand-Faktor kaum nachgewiesen werden konnte.

3. Wirkung der volatilen Anästhetika auf Vitalität, Morphologie und Gesamtproteinkonzentration mikrovaskulärer Endothelzellen und auf Vitalität von Astrozyten

Zur Untersuchung der Frage, ob volatile Anästhetika einen zytotoxischen Einfluss auf mikrovaskuläre Endothelzellen haben, wurden konfluente Zellkulturen 6 h unter normoxischer oder hypoxischer Atmosphäre in Gegenwart von Halothan, Enfluran, Isofluran, Sevofluran oder Desfluran inkubiert. Anschließend wurde die relative Zahl der vitalen Zellen mit einer photometrischen Methode bestimmt und mit der von Kontrollgruppen verglichen, die 6 h im Brutschrank verblieben waren.

Für keines der volatilen Anästhetika konnte ein zytotoxischer Einfluss nachgewiesen werden, weder bei Inkubation der Zellen unter normoxischen noch unter hypoxischen Bedingungen. Wie lichtmikroskopische Kontrollen zeigten, veränderte sich auch das morphologische Erscheinungsbild der Zellen nicht.

Die relativ ausgeprägte Resistenz mikrovaskulärer Endothelzellen gegenüber Hypoxie, die von anderen bereits beschrieben wurde, konnte hiermit bestätigt werden⁹⁴. Fischer et al. zeigten, dass 24-stündige Hypoxie die Zellen noch nicht letal schädigte und dass erst nach 48 h zytotoxische Erscheinungen sichtbar wurden^{87,95}. Dies lässt darauf schließen, dass die Hypoxie-induzierte Permeabilitätserhöhung der BHS, die im *in vitro* Modell bereits nach 1,5 h messbar war, nicht durch eine letale Schädigung der Endothelzellen hervorgerufen wurde.

Um die Ergebnisse des Zytotoxizitätstest mit einer zweiten, unabhängigen Methode zu überprüfen, wurde zusätzlich eine Vitalzählung durchgeführt. Hierbei wurden konfluente Zellkulturen 6 h unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika inkubiert. Anschließend wurde die Zahl der vitalen Zellen unter dem Mikroskop durch Auszählung mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zum Vergleich dienten wieder Kontrollkulturen, die 6 h im

Brutschrank verblieben waren. Die Ergebnisse des Zytotoxizitätstest, dass volatile Anästhetika keinen zytotoxischen Einfluss auf mikrovaskuläre Endothelzellen haben, konnten bestätigt werden.

Messungen der Gesamtproteinkonzentration in Zellysaten und Zellüberständen mikrovaskulärer Endothelzellen ergaben keinen quantitativen Unterschied zwischen Versuchsgruppen mit Zellen, die unter normoxischen Bedingungen in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika inkubiert worden waren, und der Kontrollgruppe. Auch eine Inkubation der Zellen unter hypoxischer Atmosphäre in Gegenwart oder Abwesenheit eines der volatilen Anästhetika wirkte sich nicht quantitativ auf die Gesamtproteinkonzentration aus. Dies zeigte, dass der Proteinauf- und -abbau sich die Waage hielten und nicht durch Hypoxie und/oder den Zusatz volatiler Anästhetika beeinflusst wurden.

Astrozyten stehen funktionell in engem Zusammenhang mit den cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen und beeinflussen durch die Sekretion bislang unbekannter Faktoren viele spezifische Eigenschaften der BHS¹⁰⁻¹⁶. Der oben beschriebene Zytotoxizitätstest wurde auch an Astrozytenkulturen durchgeführt, um zu untersuchen, ob volatile Anästhetika einen letal schädigenden Einfluss auf diese haben und somit indirekt die Permeabilität der BHS beeinflussen könnten. Weder unter Normoxie noch unter Hypoxie konnte eine Beeinflussung der Vitalität der Astrozyten durch volatile Anästhetika nachgewiesen werden.

4. Wirkung der volatilen Anästhetika auf die Permeabilität des *in vitro* Modells der Blut-Hirn-Schranke

Unter normoxischen Bedingungen veränderte keines der volatilen Anästhetika die Permeabilität des *in vitro* Modells der BHS gegenüber EBA und [³H]-Inulin.

Da gegenwärtig keine Veröffentlichungen existieren, in denen der Einfluss volatiler Anästhetika auf die *in vitro* BHS untersucht wurde, können unsere Ergebnisse nur mit *in vivo* Studien verglichen werden, in denen allerdings nur einige der von uns untersuchten Anästhetika eingesetzt wurden.

Chi et al. anästhesierten Ratten mit Isofluran und stellten fest, dass dadurch die Passage kleiner hydrophiler Moleküle über die BHS reduziert wurde. Der Mechanismus konnte nicht geklärt werden, aber sie vermuteten, dass die Wirkung des Isoflurans entweder auf eine Reduktion der perfundierten cerebralen Kapillaroberfläche oder auf einen direkten Einfluss auf die Permeabilität der BHS zurückzuführen sei⁹⁶. Auch Nemoto et al. setzten in ihren Versuchen Ratten zur Erforschung der BHS ein und fanden heraus, dass Halothan zu einer Erhöhung der

parazellulären Passage von Substanzen über die BHS führte. Der genaue Mechanismus blieb auch hier unklar, doch nahmen die Autoren an, dass der von ihnen gemessene Blutdruckanstieg in den cerebralen Gefäßen ebenso wie eine direkte Beeinflussung der Permeabilität cerebraler Kapillaren für den Anstieg der Stoffpassage über die BHS verantwortlich sein könnte⁹⁷. Zwei weitere Studien bestätigen das Ergebnis, dass Halothan eine Steigerung der Passage von Stoffen über die BHS induziert, doch bei beiden konnte die Erhöhung des intracerebralen Blutflusses als Ursache nicht ausgeschlossen werden^{98,99}.

Der Vorteil des in dieser Arbeit eingesetzten *in vitro* Modells der BHS liegt in seiner Unabhängigkeit von Parametern der Hämodynamik, wie Blutdruck oder Blutfluß in cerebralen Kapillaren, die *in vivo* eine große Rolle hinsichtlich der Passage von Stoffen über die BHS spielen. So kann es beispielsweise durch Dilatation cerebraler Blutgefäße zu einem Abfall des Strömungswiderstandes mit Erhöhung des intracerebralen Blutflusses kommen, der sich in einer gesteigerten parazellulären Passage über die BHS äußert^{53,100-102}. Die Ergebnisse dieser Arbeit, dass volatile Anästhetika die Permeabilität eines *in vitro* Modells der BHS nicht verändern, stehen daher durchaus nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorgestellten Studien, die die Wirkung von Isofluran bzw. Halothan auf die BHS *in vivo* untersuchten und eine Ab- bzw. Zunahme der Stoffpassage über die BHS feststellten, wenn man annimmt, dass volatile Anästhetika keinen direkten Einfluss auf Permeabilitätseigenschaften cerebraler Kapillaren haben, sondern Veränderungen der Passage von Stoffen über die BHS *sekundär*, über die Modulation der Hämodynamik, bewirken. Für einige der volatilen Anästhetika (Halothan, Enfluran) gilt es sogar als bekannt, dass sie *in vivo* zu einer Steigerung des intracerebralen Blutflusses führen¹⁰³.

Unsere weiteren Untersuchungen zeigten, dass Hypoxie im Vergleich zur Normoxie zu einer signifikanten Permeabilitätserhöhung der *in vitro* BHS gegenüber EBA und [³H]-Inulin führte. Dies konnte auch für Hypoxie in Gegenwart von Halothan, Enfluran, Isofluran, Sevofluran oder Desfluran gezeigt werden. Es konnten keine Permeabilitätsunterschiede der BHS zwischen Hypoxie in Gegenwart und Hypoxie in Abwesenheit eines der volatilen Anästhetika festgestellt werden.

Die bekannte Induktion einer Hyperpermeabilität eines Monolayers aus cerebralen Endothelzellen durch Hypoxie konnte mit diesen Ergebnissen bestätigt werden^{55,56,79,86,87,95,104}. Diese Hyperpermeabilität ist es, die *in vivo* durch Flüssigkeitsausstrom aus dem Blut ins Hirngewebe zur Ausbildung eines vasogenen Ödems führt.

Unser Ergebnis, dass der Zusatz *keines* der volatilen Anästhetika zur hypoxischen Atmosphäre eine Veränderung der Hyperpermeabilität verursachte, kann wieder nur

mit *in vivo* Studien verglichen werden. Cahn et al.¹⁰⁵ untersuchten an Wüstenspringmäusen, ob Halothan Einfluss auf die Permeabilität der BHS und auf die Ausprägung eines vasogenen Hirnödems nach 15-minütiger fokaler Ischämie mit anschließender Reperfusion hätte. Die Permeabilität der BHS wurde wie in dieser Arbeit anhand der Passage des Markers Evans blue Albumin über die BHS untersucht; Messungen des spezifischen Gewichtes verschiedener Hirnareale dienten der Bestimmung der Ödemausprägung. Es zeigte sich, dass es bei den Tieren, die nicht narkotisiert worden waren, zu einer Penetration von EBA ins Hirngewebe gekommen war, während bei den mit Halothan anästhesierten Tieren die Stoffpassage über die BHS nicht verändert war, da EBA im Hirngewebe nicht nachgewiesen werden konnte. Außerdem wies die Halothan-Gruppe im Gegensatz zur Kontrollgruppe nahezu kein Hirnödem auf. Die Autoren führen diese protektive Wirkung des Halothans auf die starke Reduktion des intracerebralen Blutflusses zurück, den sie während des Versuchs gemessen haben. Diese Ergebnisse sind in gewisser Weise widersprüchlich zu den Resultaten der oben beschriebenen Studien von Nemoto et al. etc.⁹⁷⁻⁹⁹, denn es ist nur schwer erklärbar, warum eine Halothan-Narkose unter normoxischen Bedingungen zu einer Steigerung der Passage von Stoffen über die BHS führen soll, in einem Ischämie-Modell jedoch dies verhindern und damit protektiv wirken soll.

Smith und Marque¹⁰⁶ zeigten an Hunden, dass Barbiturate die Ausprägung eines cerebralen Ödems vermindern, während Halothan und Enfluran keinen Einfluss darauf haben. Allerdings wurde in ihren Versuchen die Hyperpermeabilität der BHS und damit das Entstehen eines vasogenen Hirnödems nicht durch Ischämie/Hypoxie, sondern durch das Erzeugen eines fokalen Kältetraumas im Gehirn und folglich durch eventuell andere pathogenetische Mechanismen ausgelöst. Damit ist diese Studie nur bedingt vergleichbar.

Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass volatile Anästhetika auch unter hypoxischen Bedingungen auf die (Hyper-)Permeabilität der BHS keinen *direkten* Einfluss haben. Eine durch volatile Anästhetika ausgelöste *sekundäre* Veränderung der Stoffpassage über die BHS *in vivo* durch die Beeinflussung hämodynamischer Parameter, wie sie von Cahn et al.¹⁰⁵ für Halothan vermutet wird, ist gut vorstellbar und steht in keinem Widerspruch zu unseren Ergebnissen. Derzeit liegen jedoch keine weiteren Studien dazu vor.

Wie oben bereits erwähnt, liegt ein Vorteil der in dieser Arbeit eingesetzten *in vitro* BHS darin, dass die Permeabilitätsmessungen unabhängig von Parametern der Hämodynamik sind, die *in vivo* die BHS durchaus beeinflussen. Unsere Messungen veränderter Permeabilität, wie sie unter Hypoxie nachweisbar sind, lassen sich daher eindeutig auf Veränderungen auf zellulärer Ebene zurückführen und damit auf einen

direkten Einfluss des Stimulus auf die BHS. Im *in vivo* Modell wäre dies nicht möglich, da auch Veränderungen des cerebralen kapillären Blutflusses, des cerebralen Blutdruckes etc. als Ursache nicht ausgeschlossen werden können.

Allerdings muss davon ausgegangen werden, dass mit der *in vitro* BHS geringfügige Permeabilitätsveränderungen kaum detektiert werden könnten. Dies ist mit der im Vergleich zur *in vivo* Situation verminderten Ausprägung der tight junctions zwischen den kultivierten mikrovaskulären Endothelzellen zu erklären, die zu einer erhöhten parazellulären Permeabilität führt³⁹. Dieses „Leck“ im System bedingt eine Vergrößerung der Messergebnisse. Deutlich wird dies beim Vergleich der Permeabilitätsstudien der Marker EBA und [³H]-Inulin unter *hypoxischen* Bedingungen. Während der Messwert der Permeabilität für EBA 321% betrug, wurde für [³H]-Inulin nur 152% gemessen (der jeweilige Wert der Kontrollgruppe unter normoxischen Bedingungen war 100%). Der Grund dafür liegt in der unterschiedlichen Molekülgröße bzw. in dem Molekulargewicht von EBA (69 kD) und [³H]-Inulin (5 kD). Dem wesentlich kleineren [³H]-Inulin gelingt schon unter normoxischen Bedingungen in großem Maße die Passage über die insuffizienten tight junctions des Monolayers, so dass unter hypoxischen Bedingungen eine Steigerung der Permeabilität nicht mehr so stark ins Gewicht fällt und im Vergleich zur Kontrollgruppe nur in einem 1,5-fach gesteigerten Permeabilitätswert resultiert. Bei Verwendung eines noch kleineren Markermoleküls wären die Unterschiede der Permeabilität zwischen Normoxie und Hypoxie wahrscheinlich gar nicht mehr feststellbar. Die Molekülgröße von EBA verhindert eine übermäßige Passage über die *in vitro* BHS unter normoxischen Bedingungen, weil es kaum durch die „undichten Stellen“ des Monolayers passt. Die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität führt jedoch zu einer 3-fachen Steigerung der Passage von EBA. Dieses eindrucksvolle Ergebnis darf aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass Veränderungen der Permeabilität durch Stimuli, die weniger wirksam sind als Hypoxie, mit dem *in vitro* Modell der BHS auch unter Einsatz von EBA gegebenenfalls nicht feststellbar sind. Dazu wären Zellmonolayer erforderlich, deren tight junctions in Ausdehnung und Komplexität denen *in vivo* ähneln. Eine Verbesserung des *in vitro* Systems wäre durch Co-Kultivierung der Endothelzellen mit Astrozyten möglich, da dadurch einige Eigenschaften der *in vivo* BHS verstärkt induziert werden (s.u.).

Der Einsatz der Marker EBA und [³H]-Inulin hatte folgende Gründe: Sie unterscheiden sich im Molekulargewicht um den Faktor 14. Daher besitzen sie eine erheblich verschiedene Größe, was hinsichtlich der Passage über den Zellmonolayer von Bedeutung war.

Außerdem konnte so mit zwei unterschiedlichen Methoden, nämlich photometrisch und durch Szintillationszählung, die Permeabilität gemessen werden.

Des weiteren passiert [^3H]-Inulin den Monolayer ausschließlich parazellulär⁹⁰, wohingegen für EBA auch der transzelluläre Weg über Transportmechanismen beschrieben ist¹⁰⁷, der für unsere Zwecke unerwünscht war. Unveröffentlichte Untersuchungen von Fischer et al. zeigten jedoch, dass in dem von uns eingesetzten *in vitro* Modell für EBA hauptsächlich die parazelluläre Passage von Bedeutung ist.

Die Passage (d.h. die pro Zeiteinheit durch den Monolayer übergetretene Menge) von EBA und [^3H]-Inulin erfolgt unter normoxischen Bedingungen von Anfang an *linear*. Durch den Einfluss von Hypoxie kommt es jedoch in der ersten Zeit des Versuchs zu einer Steigerung der Passage, die nach etwa 30-60 min ihr Maximum erreicht hat und dann viele Stunden konstant bleibt. Das heißt, unter hypoxischen Bedingungen erfolgt erst nach 30-60 min die Passage von EBA und [^3H]-Inulin über den Monolayer *linear*. Für Permeabilitätsmessungen unter hypoxischer Atmosphäre eignet sich eine Versuchsdauer von 3 h, denn die Permeabilitätssteigerung zu diesem Zeitpunkt (gegenüber normoxischen Kontrollgruppen) unterscheidet sich nicht wesentlich von Messungen nach 4,5 h, 6 h oder 12 h. Für die Untersuchungen mit den volatilen Anästhetika dagegen erschien uns eine Versuchsdauer von 6 h aus klinischen Gesichtspunkten sinnvoll, da die durchschnittliche Dauer von Inhalationsnarkosen im operativen Bereich, die weit unter 6 h liegt, überschritten werden sollte (bei längeren Operationen wird die total intravenöse Anästhesie bevorzugt). Zusätzlich zu dieser langen Einwirkungszeit wurden die volatilen Anästhetika in einer Konzentration von 4 MAC eingesetzt; dies ist eine hohe Dosierung, die klinisch nicht üblich ist. Somit wurden sowohl bei der Versuchslänge als auch bei der eingesetzten Konzentration die in der klinischen Praxis üblichen Werte überschritten, so dass im Falle einer in der Praxis auftretenden Permeabilitätsveränderung durch volatile Anästhetika diese auch bemerkt worden wäre.

5. Wirkung der volatilen Anästhetika auf die VEGF-Expression in mikrovaskulären Endothelzellen

Um die Ergebnisse unserer Permeabilitätsuntersuchungen zu bestätigen, wurde die Expression des vascular endothelial growth factor (VEGF) in cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen untersucht. Dabei wurden die Zellkulturen unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen in Gegenwart oder Abwesenheit eines der volatilen Anästhetika inkubiert.

Bei VEGF handelt es sich um ein Glykoprotein, das unter Hypoxie von verschiedenen Zelltypen vermehrt produziert wird und in seiner Wirkung besondere Spezifität für Endothelzellen zeigt^{61,65,67-71}. VEGF stimuliert Endothelzellwachstum und Migration *in vitro*^{71,108} und Angiogenese *in vivo*^{72,73}. Außerdem erhöht es *in vivo* und *in vitro* die

Gefäßpermeabilität^{74-77,79}, weswegen es auch als vascular permeability factor (VPF) bezeichnet wird^{67,68,70}. VEGF-induzierte endotheliale Hyperpermeabilität wird durch direkte Wirkung an den VEGF-Rezeptoren 1 und 2 auf den Endothelzellen vermittelt¹⁰⁹ und wird wahrscheinlich durch Aufgehen der tight junctions mit Spaltbildung zwischen den Endothelzellen^{110,111}, Fenestrierung des vorher unfenestrierten Endothels^{12,75,112} und erhöhte Transcytose verursacht^{110,111}. So kommt es zu einer gesteigerten Permeabilität für Wasser, Elektrolyte und Plasmaproteine wie Albumin¹¹³.

Es wurde gezeigt, dass die permeabilitätserhöhende Wirkung von VEGF in dermalen Kapillaren 50.000 mal stärker als die von Histamin ist¹¹⁴. Die VEGF-Expression in Hirntumoren, die dort in ischämischen Arealen am größten ist, ist für die Hyperpermeabilität der Tumorkapillaren und für das peritumorale Ödem verantwortlich^{115,116}. Es wird daher vermutet, dass *in vivo* unter hypoxischen Bedingungen die Sekretion von VEGF zur Hyperpermeabilität cerebraler Kapillaren und damit schließlich zur Ausbildung eines vasogenen Hirnödems führt¹¹¹.

Fischer et al. demonstrierten kürzlich anhand eines *in vitro* Modells der BHS, das aus cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen bestand, dass Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität durch autokrine VEGF-Expression hervorgerufen wurde⁷⁹. Weiterhin zeigten sie, dass die Reduktion der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität durch die Barbiturate Thiopental und Methohexital über die verminderte Sekretion von VEGF vermittelt wurde⁸⁶.

Aufgrund des engen Zusammenhanges zwischen VEGF-Expression in mikrovaskulären Endothelzellen und kapillärer Permeabilität erschien uns der Nachweis der VEGF-Expression daher als eine geeignete Methode, um Veränderungen der Permeabilität der *in vitro* BHS durch volatile Anästhetika indirekt zu untersuchen und somit unsere Ergebnisse der Permeabilitätsuntersuchungen zu bestätigen.

Die VEGF mRNA-Expression in cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen wurde mit Northern-Blot-Analysen nachgewiesen. Unter normoxischen Bedingungen veränderte keines der volatilen Anästhetika die VEGF mRNA-Expression quantitativ. Hypoxie erhöhte erwartungsgemäß die Expression von VEGF mRNA signifikant. Dies konnte auch für Hypoxie mit dem Zusatz von Halothan, Enfluran, Isofluran, Sevofluran oder Desfluran gezeigt werden. Es konnten jedoch keine quantitativen Unterschiede zwischen Hypoxie in Gegenwart und Hypoxie in Abwesenheit eines der volatilen Anästhetika festgestellt werden.

Da jedoch die mRNA-Expression nicht immer quantitativ mit der Expression des entsprechenden Proteins und damit seiner wirksamen Form korreliert, wurden zur Bestätigung der Northern-Blot-Analyse zusätzlich Versuche zur Bestimmung der

VEGF-Expression in mikrovaskulären Gehirndothelzellen auf Proteinebene durchgeführt.

Western-Blot-Analysen ergaben, dass keines der volatilen Anästhetika die Expression von VEGF unter normoxischer Atmosphäre oder die erhöhte Expression von VEGF unter hypoxischer Atmosphäre quantitativ veränderte. Mit Western-Blots ist der Proteinnachweis sehr spezifisch, jedoch können aufgrund einer reduzierten Empfindlichkeit des Nachweises *geringe* Unterschiede in der Quantität der Proteinexpression nicht detektiert werden. Daher wurden anschließend ELISAs durchgeführt, die einen sehr genauen quantitativen Vergleich der VEGF-Expression der verschiedenen Versuchsgruppen ermöglichten. Auch hier zeigte sich keine Veränderung der VEGF-Expression durch volatile Anästhetika.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass Halothan, Enfluran, Isofluran, Sevofluran und Desfluran weder auf mRNA- noch auf Proteinebene eine quantitative Veränderung der VEGF-Expression in cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen unter Normoxie oder Hypoxie bewirken. Die Ergebnisse der Permeabilitätsstudien konnten damit bestätigt werden.

6. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen lassen vermuten, dass die volatilen Anästhetika Halothan, Enfluran, Isofluran, Sevofluran und Desfluran keinen Einfluss auf Permeabilitätseigenschaften von cerebralen mikrovaskulären Endothelzellen haben, die *in vivo* die BHS bilden.

Die in früheren *in vivo* Studien beschriebenen teilweise widersprüchlichen Untersuchungsergebnisse über permeabilitätsbeeinflussende Wirkungen einiger dieser Anästhetika lassen sich daher vermutlich eher auf einen sekundären Effekt, nämlich auf Veränderung hämodynamischer Parameter, als auf eine direkte Wirkung auf die BHS zurückführen. Die Durchführung weiterer tierexperimenteller Studien mit dem Versuch der Konstanthaltung der cerebralen Hämodynamik könnte Aufschluss darüber geben.

Außerdem sollte das *in vitro* Modell der BHS verbessert werden, indem die mikrovaskulären Schweinegehirndothelzellen mit Astrozyten co-kultiviert werden. Es hat sich nämlich gezeigt, dass dadurch die *in vivo* Charakteristika der BHS insgesamt besser nachgeahmt werden. So kommt es beispielsweise durch eine gesteigerte Ausbildung der tight junctions zwischen den Endothelzellen zu wesentlich dichteren Zellmonolayern und damit zu einer reduzierten parazellulären Permeabilität. Dies ermöglicht genauere Permeabilitätsmessungen, durch die schon geringere Änderungen der Permeabilitätseigenschaften nachweisbar sein sollten.

V. Literaturverzeichnis

1. Ehrlich P. Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus; eine farbenanalytische Studie. Hirschwald, Berlin. 1885.
2. Lewandowski M. Zur Lehre der Cerebrospinalflüssigkeit. Z. Klin. Med. 1900;480-494.
3. Davson H. History of the blood-brain barrier concept. Implications of the blood-brain barrier and its manipulation. Plenum, New York. 1989;1:27-52.
4. Kristensson K, Olsson Y. Accumulation of protein tracers in pericytes of the central nervous system following systemic injection in immature mice. Acta Neurol. Scand. 1973;49:189-194.
5. van Deurs B. Structural aspects of brain barriers, with special reference to the permeability of the cerebral endothelium and choroidal epithelium. Int. Rev. Cytol. 1980;65:117-191.
6. Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. Cardiovasc. Res. 1996 Oct;32(4):687-98.
7. Le Beux YJ, Willemot J. Actin- and myosin-like filaments in rat brain pericytes. Anat. Rec. 1978;190:811-826.
8. Antonelli-Orlidge A, Saunders K, Smith S, et al. An activated form of transforming growth factor β is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989;86:4544-8.
9. Bennett HS, Luft JH, Hampton JC. Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. Am. J. Physiol. 1959;381-390.
10. Schlosshauer B. The blood-brain barrier: Morphology, Molecules, and Neurothelin. BioEssays. 1993;15:341-346.

11. Beck DW, Vinters HV, Hart MN, et al. Glial cells influence polarity of the blood-brain barrier. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1984;43:219-224.
12. DeBault LE, Cancilla PA. Gamma-glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro. *Science.* 1980;207:653-655.
13. Janzer RC, Raff MC. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature.* 1987;325:253-257.
14. Tao-Cheng JH, Nagy Z, Brightman MW. Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. *J. Neurosci.* 1987;7:3293-3299.
15. Goldstein GW. Endothelial cell-astrocyte interactions: A cellular model of the blood-brain barrier. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1988;529:31-39.
16. Risau W, Wolburg H. Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 1990;13:174-178.
17. Bradbury MWB. The structure and function of the blood-brain barrier. *Fed. Proc.* 1984;43:186-190.
18. Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell. Biol.* 1969;40:648-677.
19. Betz AL, Goldstein GW. Brain capillaries: Structure and function. *Handbook of Neurochemistry.* 1984;7:465-484, Plenum, New York.
20. Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell. Biol.* 1967;34:207-217.
21. Madara JL. Tight junction dynamics: is paracellular transport regulated? *Cell.* 1988;53:497-498.
22. Cornfold EM, Braun LD, Crane PD, et al. Blood-brain barrier restriction of peptides and the low uptake of enkephalins. *Endocrinology.* 1978;103:1297-1303.

23. Crone C. The permeability of brain capillaries to non-electrolytes. *Acta Physiol. Scand.* 1965;64:407-417.
24. Rapoport S-I, Ohno K, Pettigrew KD. Drug entry into the brain. *Brain Res.* 1979;172:354-359.
25. Kühnel W. Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. Georg Thieme Verlag; 1995.
26. Pardridge WM. Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier. *Physiol. Rev.* 1983;63:1481-1535.
27. Ghersi-Egea JF, Minn A, Siest G. A new aspect of the protective functions of the blood-brain barrier: activities of four drug-metabolizing enzymes in isolated rat brain microvessels. *Life Sci.* 1988;42:2515-2523.
28. Sage MR, Wilson AJ. The Blood-Brain Barrier: An important concept in Neuroimaging. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 1994;15:601-622.
29. Crone C. Facilitated transfer of glucose from blood into brain tissue. *J. Physiol. (Lond.).* 1965;181:103-113.
30. Dick APK, Harik SI, Klip A, et al. Identification and characterization of the glucose transporter of the blood-brain barrier by cytocholasin B binding and immunological reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984;81:7233-7237.
31. Banos G, Daniel PM, Pratt OE. Saturation of a shared mechanism which transports L-arginine and L-lysine into the brain of the living rat. *J. Physiol. (London).* 1974;236:29-41.
32. Oldendorf W, Szabo J. Amino acid assignment to one of the three blood-brain barrier amino acid carriers. *Am. J. Physiol.* 1976;230:94-98.
33. Wade LA, Katzmann R. Synthetic amino acids and the nature of L-DOPA transport at the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 1975;25:837-842.

34. Zinke H, Möckel B, Frey A, et al. Blood-brain barrier: a molecular approach to its structural and functional characterization. *Prog. Brain Res.* 1992;91:103-116.
35. Audus KL, Borchardt RT. Characterization of an in vitro blood-brain barrier model system for studying drug transport and metabolism. *Pharm. Res.* 1986a;3:81-87.
36. Baranczyk-Kuzma A, Audus K, Borchardt RT. Catecholamine-metabolizing enzymes of bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. *J. Neurochem.* 1986;46:1956-1960.
37. Scriba GK, Borchardt RT. Metabolism of catecholamine esters by cultured bovine brain microvessel endothelial cells. *J. Neurochem.* 1989;53:610-615.
38. Balconi G, Dejana E. Cultivation of endothelial cells: limitations and perspectives. *Med. Biol.* 1986;64:231-245.
39. Goldstein GW. In vitro studies of the blood-brain barrier. *Polym. Prep.* 1986;27:425.
40. Dehouck MP, Meresse S, Delorme P, et al. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J. Neurochem.* 1990;54:1798-1801.
41. Rubin LL, Hall DE, Porter S, et al. A cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell. Biol.* 1991;115:1725-1735.
42. Rutten MJ, Hoover RL, Karnovsky MJ. Electrical resistance and macromolecular permeability of brain endothelial monolayer cultures. *Brain Res.* 1987;425:301-310.
43. Crone C, Olesen SP. Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res.* 1982;241:49-55.

44. Erben M, Decker S, Franke H, et al. Electrical resistance measurements on cerebral capillary endothelial cells - a new technique to study small surface areas. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 1995;30:227-238.
45. Fischer S, Renz D, Schaper W, et al. Effects of barbiturates on the expression of vascular endothelial growth factor in hypoxic cultures of porcine brain derived microvascular endothelial cells. *Eur. J. Cell Biol.* 1996;69:259 (abstr.).
46. Hart MN, VanDyk LF, Moore SA, et al. Differential opening of the brain endothelial barrier following neutralization of the endothelial luminal anionic charge in vitro. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1987;46:141-153.
47. Pardridge WM. New directions in blood-brain barrier research. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1988;529:50-60.
48. White FP, Dutton GR, Norenberg MD. Microvessel isolated from rat brain: Localization of astrocyte processes by immunohistochemical techniques. *J. Neurochem.* 1981;36:328-332.
49. Williams SK, Gillis JF, Matthews MA, et al. Isolation and characterization of brain endothelial cells: Morphology and enzyme activity. *J. Neurochem.* 1980;35:374-381.
50. Kumar S, Kumar P, Pey D, et al. Heterogeneity in endothelial cells with special reference to their growth related proteins. *Angiogenesis in Health and Diseases*, Plenum Press, New York. 1994:63-78.
51. Nordborg C, Sokrab TE, Johansson BB. The relationship between plasma protein extravasation and remote tissue changes after experimental brain infarction. *Acta Neuropathol.* 1991;82:118-126.
52. Olsson Y, Crowell RM, Klatzo I. The blood-brain barrier to protein tracers in focal cerebral ischemia and infarction caused by occlusion of the middle cerebral artery. *Acta Neuropathol. (Berl.).* 1971;18:89-102.

53. Hatashita S, Hoff JT. Brain edema and cerebrovascular permeability during cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 1990;21:582-588.
54. Baethmann A, Maier-Hauff K, Kempski O, et al. Therapeutic considerations in blood-brain barrier disturbances. *Acta Neuropathol. (Berl.)*. 1983;Suppl. VIII:119-128.
55. O'Brien MD, Jordan MM, Waltz AG. Ischemic cerebral edema and the blood-brain barrier. *Arch. Neurol.* 1974;30:461-465.
56. Olesen S-P. Rapid increase in blood-brain barrier permeability during severe hypoxia and metabolic inhibition. *Brain Res.* 1986;368:24-29.
57. Abbott NJ, Revest PA. Control of brain endothelial permeability. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 1991;3:39-72.
58. Betz AL. Alterations in cerebral endothelial cell function in ischemia. *Adv. Neurol.* 1996;71:301-313.
59. Ting P, Masaoka H, Kuroiwa T, et al. Influence of blood-brain barrier opening to proteins on development of post-ischaemic brain injury. *Neurol. Res.* 1986;8:146-151.
60. Betz AL, Coester HC. Effect of steroids on edema and sodium uptake of the brain during focal ischemia in rats. *Stroke*. 1990;21:1199-1204.
61. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*. 1989;246:1309-1312.
62. Sampaola S, Nakagawa Y, Iannotti F, et al. Blood-brain barrier permeability to micromolecules and edema formation in the early phase of incomplete continuous ischemia. *Acta Neuropathol.* 1991;82:107-111.
63. Seeman P. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. *Pharmacol. Rev.* 1972;24:583-655.

64. Senger DR, Dvorak AM, Peruzzi CA, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219:983-985.
65. Shweiki D, Itin A, Soffer D, et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992;359:843-845.
66. Baethmann A. Pathophysiological and pathochemical aspects of cerebral edema. *Neurosurg. Rev.* 1978;1:85-100.
67. Detmar M, Brown LF, Berse B, et al. Hypoxia regulates the expression of Vascular Permeability Factor/ Vascular Endothelial Growth Factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 1997;108:263-268.
68. Gleadle JM, Ratcliffe PJ. Induction of hypoxia-inducible factor-1, erythropoietin, vascular endothelial growth-factor, and glucose transporter-1 by hypoxia : evidence against a regulatory role for src kinase. *Blood*. 1997;89:503-509.
69. Ijichi A, Sakuma S, Tofilon PJ. Hypoxia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Normal Rat Astrocyte Cultures. *Glia*. 1995;14:87-93.
70. Sandner P, Wolf K, Bergmaier U, et al. Induction of VEGF and VEGF receptor gene expression by hypoxia: divergent regulation in-vivo and in-vitro. *Kidney Int.* 1997;51:448-453.
71. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel Heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989;161:851-858.
72. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 1989;84:1470-1478.

73. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular Endothelial Growth Factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989;246:1306-1309.
74. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al. Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor, Microvascular Hyperpermeability, and Angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 1995;146:1029-1039.
75. Roberts G, Palade G. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J. Cell Sci.* 1995;108:2369-2379.
76. Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, et al. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res.* 1986;46:5629-5632.
77. Yeo T-K, Senger DR, Dvorak HF, et al. Glycosylation is essential for efficient secretion but not for permeability-enhancing activity of vascular permeability factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991;179:1568-1575.
78. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J. Exp. Med.* 1990;172:1535-1545.
79. Fischer S, Clauss M, Wiesnet M, et al. Hypoxia induces permeability in brain microvessel endothelial cells via VEGF and NO. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol. 45):C812-C820.* 1999;276
80. Hoff JT, Smith AL, S.L. N. Barbiturate protection from cerebral infarction in primates. *Stroke.* 1975;6:28-33.
81. Arnfred I, Secher O. Anoxia and barbiturates - tolerance to anoxia in mice influenced by barbiturates. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1962;139:67-74.
82. Michenfelder JD, Theye RA. Cerebral protection by thiopental during hypoxia. *Anesthesiology.* 1973;39:510-517.

83. Michenfelder JD, Milde JH, Sundt TM. Cerebral protection by barbiturate anesthesia. Use after middle cerebral artery occlusion in Java monkeys. *Arch. Neurol.* 1976;33:345-350.
84. Robinson-White AJ, Muldoon SM, Robinson RC. Inhibition of inositol phospholipid hydrolysis in endothelial cells by pentobarbital. *Eur. J. Pharmacol.* 1989;172:291-303.
85. Fischer S, Renz D, Schaper W, et al. Hypoxieprotektion der Blut-Hirn-Schranke: Effekte von Barbituraten auf hypoxische Kulturen von mikrovaskulären Endothelzellen. *Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* 1997;32:1-4.
86. Fischer S, Renz D, Schaper W, et al. Barbiturates decrease the expression of vascular endothelial growth factor in hypoxic cultures of porcine brain-derived microvascular endothelial cells. *Brain. Res. Mol. Brain Res.* 1998;60:89-97.
87. Fischer S, Renz D, Schaper W, et al. Effects of barbiturates on hypoxic cultures of brain derived microvascular endothelial cells. *Brain Res.* 1996;707:47-53.
88. Mischeck U, Meyer J, Galla H-J. Characterization of gamma-glutamyl transpeptidase activity of cultured endothelial cells from porcine brain capillaries. *Cell Tissue Res.* 1989;256:221-226.
89. Patterson cE, Rhoades RA, Garcia JGN. Evans blue dye as a marker of albumin clearance in cultured endothelial monolayer and isolated lung. *J. Appl. Physiol.* 1992;72:865-873.
90. Milton S, Knutson V. Comparison of the function of the tight junctions of endothelial cells and epithelial cells in regulating the movement of electrolytes and macromolecules across the cell monolayer. *J. Cell. Physiol.* 1990;144:498-504.

91. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987;162:156-159.
92. Bown TA. Gentechnologie für Einsteiger. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; 1993.
93. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular Cloning. Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 1989.
94. Gobbel GT, Chan TY, Gregory GA, et al. Response of cerebral endothelial cells to hypoxia: modification by fructose-1,6-bisphosphate but not glutamate receptor antagonists. *Brain Res.* 1994;653:23-30.
95. Fischer S, Renz D, Wiesnet M, et al. Hypothermia abolishes hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1999;74:135-144.
96. Chi OZ, Anwar M, Sinha AK, et al. Effects of isoflurane on transport across the blood-brain barrier. *Anesthesiology.* 1992;76:426-431.
97. Nemoto EM, Stezoski SW, MacMurdo D. Glucose transport across the rat blood-brain barrier during anesthesia. *Anesthesiology.* 1978;49:170-176.
98. Angel C, Bounds HMJ, Perry A. A comparison of the effects of halothane on blood-brain barrier and memory consolidation. *Dis. Nerv. Syst.* 1972;33:87-93.
99. Forster A, van Horn K, Marshall LF, et al. Anesthetic effects on blood-brain barrier function during acute arterial hypertension. *Anesthesiology.* 1978;49:26-30.
100. Kuroiwa T, Cahn R, Juhler M, et al. Role of extracellular proteins in the dynamics of vasogenic brain edema. *Acta Neuropathol.* 1985;66:3-11.
101. Gelman S, Fowler K, Smith L. Regional blood flow during isoflurane and halothane anesthesia. *Anesth. Analg.* 1984;63:557-565.

102. Eintrei C, Leszniewski W, Carlsson C. Local application of ¹³³Xenon for measurement of regional cerebral blood flow (rCBF) during halothane, enflurane, and isoflurane anesthesia in humans. *Anesthesiology*. 1985;63:391-394.
103. Larsen R. *Anästhesie*. 5. ed. Urban und Schwarzenberg; 1995.
104. Ogawa S, Koga S, Kuwabara K, et al. Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels. *Am. J. Physiol*. 1992;262:C546-C554.
105. Cahn R, Dupont JM, Borzeix MG, et al. Effect of halothane on ischemic brain edema. *Adv. Neurol*. 1990;52:93-96.
106. Smith AL, Marque JJ. Anesthetics and cerebral edema. *Anesthesiology*. 1976;45:64-72.
107. Milici A, Watrous N, Stukenbrok H, et al. Transcytosis of albumin in capillary endothelium. *J. Cell Biol*. 1987;105:2603-2612.
108. Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, et al. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving avb3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am. J. Pathol*. 1996;149:293-305.
109. Hippenstiel S, Krull M, Ikemann A, et al. VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells. *Am. J. Physiol*. 1998;274:L 678-684.
110. Collins PD, Connolly DT, Williams TJ. Characterization of the increase in vascular permeability induced by vascular permeability factor in vivo. *Br. J. Pharmacol*. 1993;109:195-199.
111. Criscuolo GR. The genesis of peritumoral vasogenic brain edema and tumor cysts: a hypothetical role for tumor-derived vascular permeability factor. *Yale J. Biol. Med*. 1993;66:277-314.

112. Roberts WG, Palade GE. Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res.* 1997;57:765-772.
113. Kevil CG, Payne DK, Mire E, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J. Biol. Chem.* 1998;273:15099-15103.
114. Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, et al. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res.* 1990;50:1774-1778.
115. Plate KH, Breier G, Weich HA, et al. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature.* 1992;359:845-848.
116. Berse B, Brown LF, Van de Water L, et al. Vascular Permeability Factor (Vascular Endothelial Growth Factor) Gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol. Biol. Cell.* 1992;3:211-220.

VI. Anhang

1. Material

Allgemeines:

Geschützte Warennamen (Warenzeichen) werden *nicht* besonders kenntlich gemacht. Aus dem Fehlen eines solchen Hinweises kann also nicht geschlossen werden, dass es sich um einen freien Warennamen handelt.

Wasser wurde im Ionenaustauscher demineralisiert. Anschließend wurde es in 2 l Flaschen abgefüllt und autoklaviert.

Wenn nicht anders angegeben, handelte es sich bei den genannten Lösungen stets um *wässrige* Lösungen.

Beispiel: Zur Herstellung einer *10%igen Dextran-Lösung* wurden 10 g Dextran in Wasser aufgelöst und mit weiterem Wasser auf 100 g Endgewicht aufgefüllt.

Wenn nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von der Fa. Sigma, Deisenhofen, bezogen.

M1 Gasgemisch: Sauerstoff, Kohlendioxid und Stickstoff in unterschiedlichen Konzentrationen bereits vorgemischt in Gasdruckflaschen bezogen (Fa. Messer Griesheim, Frankfurt am Main)

M2 Halothan: Fluothane (Fa. Zeneca GmbH, Planckstadt)

M3 Enfluran: Ethrane (Fa. Abbott GmbH, Wiesbaden)

M4 Isofluran: Forene (Fa. Abbott GmbH, Wiesbaden)

M5 Sevofluran: Sevorane (Fa. Abbott GmbH, Wiesbaden)

M6 Desfluran: Suprane (Fa. Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim)

M7 Earle Salz-Lösung (Ansatz für 1 l):

6,8 g	NaCl
0,4 g	KCl
0,14 g	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
0,2 g	MgSO ₄ x 7H ₂ O
0,2 g	CaCl ₂ x 2H ₂ O
1,0 g	D-Glucose

Die Substanzen wurden eingewogen und durch Rühren in Wasser gelöst. Das Volumen wurde auf 1 l aufgefüllt. Dann wurde die Lösung autoklaviert. Nun wurden 2200 mg NaHCO₃ darin gelöst und die Lösung steril filtriert.

M8 BMEC-Medium ohne FCS:

500 ml	M199-Medium (Fa. Life-Technologies, Eggenheim)
10 ml	Penicillin-Streptomycin (Fa. Life-Technologies, Eggenheim)
5 ml	Amphotericin B (Fungizone) (Fa. Life-Technologies, Eggenheim)

M9 Dispase-Lösung: 5 g Dispase II (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurden in 45 ml BMEC-Medium ohne FCS (M8) gelöst und anschließend steril filtriert.

M10 Dextran-Lösung (Ansatz für 1 l):

150 g	Dextran
6,8 g	NaCl
0,4 g	KCl
0,14 g	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
0,2 g	MgSO ₄ x 7H ₂ O
0,2 g	CaCl ₂ x 2H ₂ O
1,0 g	D-Glucose

Die Substanzen wurden eingewogen und durch Rühren in Wasser gelöst. Das Volumen wurde auf 1 l aufgefüllt. Dann wurde die Lösung autoklaviert. Nun wurden 2200 mg NaHCO₃ darin gelöst und die Lösung steril filtriert.

M11 Siebgewebe aus Polyester (Fa. MAGV, Rabenau-Lohndorf)

M12 Kollagenase/Dispase (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

M13 BMEC-Medium:

400 ml	M199-Medium (Fa. Life-Technologies, Eggenheim)
80 ml	FCS (fetales Kälberserum) (Fa. Greiner, Frickenhausen)
8 ml	Penicillin-Streptomycin (Fa. Life-Technologies, Eggenheim)
4 ml	Amphotericin B (Fa. Life-Technologies, Eggenheim)

M14 FCS: Fetales Kälberserum (Fa. Sigma, Deisenhofen)

M15 Falconröhrchen: PP-Röhrchen (Fa. Greiner, Nürtingen)

M16 Cryoröhrchen (Fa. Nunc, Wiesbaden)

M17 Lösungen für die Astrozytenisolierung:

Krebs-Ringer-Puffer (KRB) (Ansatz für 1 l):

7,07 g NaCl

0,36 g KCl

0,166 g KH_2PO_4

2,14 g NaHCO_3

2,57 g D-Glucose

Die Substanzen wurden eingewogen und durch Rühren in Wasser gelöst. Das Volumen wurde auf 1 l aufgefüllt.

Lösung 1:

100 ml KRB

0,3 g BSA

0,8 ml $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung (3,82%ig)

Lösung 2:

25 ml Lösung 1

6,25 mg Trypsin (Life-Technologies, Eggenheim)

Lösung 3:

15 ml Lösung 1

1,2 mg DNase (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

7,8 mg SB Trypsininhibitor

0,15 ml $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung (3,82%ig)

Lösung 4:

21 ml Lösung 1

4 ml Lösung 2

Lösung 5:

12,5 ml Lösung 1

100 μl $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung (3,82%ig)

15 μl CaCl_2 -Lösung (1,2%ig)

M18 BME-Medium (Fa. Life-Technologies, Eggenheim)

M19 Trypsin EDTA-Lösung (Fa. Life-Technologies, Eggenheim)

M20 Astrozytenmedium: Astrozyte Basal Medium (CellSystems, St.Katharinen)

M21 Endothelzellmedium: Endothelial Cell Growth Medium MV (Promocell, Heidelberg)

M22 Kollagen Typ 1: Rattenschwanz Kollagen Typ 1 (Fa. BD, Heidelberg)

M23 Petrischalen (Mit Kollagen beschichtet, Durchmesser 9 cm): Biocoat (Fa. BD, Heidelberg)

M24 Fluoreszenzmarkiertes LDL (Fa. Paesel und Lorei, Hanau)

M25 PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung) (Ansatz für 1 l):

8,0 g NaCl

0,2 g KCl

1,442 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

0,2 g KH_2PO_4

0,1 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ h}_2\text{O}$

Die Substanzen wurden eingewogen und durch Rühren in Wasser gelöst. Das Volumen wurde auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung wurde anschließend steril filtriert.

M26 Methanol (Fa. Roth, Karlsruhe)

M27 Anti-cow-glial-fibrillary-acidic-protein (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

M28 CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Fa. Promega, Mannheim)

M29 Filtermembran-Inserts: Millicell Culture Plate Inserts PICM 01250; 12 mm Durchmesser; 0,6 cm² Membranfläche; 0,4 µm Porengröße (Fa. Millipore, Eschborn)

M30 24-Well-Platten (Fa. Corning Costa, Bodenheim)

M31 BSA: fettsäurefreies Rinderserumalbumin (Fa. Sigma, Deisenhofen)

M32 M199-Medium (Fa. Life-Technologies, Eggenheim)

M33 Tritium-markiertes Inulin ([³H]-Inulin) (Fa. Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg)

M34 Szintillationscocktail: Rotiszint Ecoplus (Fa. Roth, Karlsruhe)

M35 Szintillationsröhrchen (Fa. Fisher Scientific GmbH, Schwerte)

M36 Lysispuffer (Ansatz für 100 ml):

1000 mg Triton X100
400 mg SDS
37 mg EDTA
121 mg TRIS/HCl, pH 7,4

Die Substanzen wurden eingewogen und durch Rühren in Wasser gelöst. Das Volumen wurde auf 100 ml aufgefüllt

Zu 10 ml des Lysispuffers wurden kurz vor Benutzung 0,1 ml des Proteasemix und 10 µl PMSF der Konzentration 0,5 mol/l gegeben.

Proteasemix-Lösung (Ansatz für 10 ml):

1 mg Leupeptin
1 mg Chymostatin
1 mg Pepstatin

Die Substanzen wurden eingewogen und in 10 ml Wasser gelöst.

M37 Guanidiniumthiocyanatpuffer (Ansatz für 100 ml):

47,25 g Guanidiniumthiocyanat (Fa. Roth, Karlsruhe)
2,5 ml Natriumcitrat-Lösung der Konzentration 1 mol/l, pH 7,0
0,5 g N-Lauroyl-Sarcosin
720 µl 2-Mercaptoethanol

Die Substanzen wurden eingewogen und durch Rühren in Wasser gelöst. Das Volumen wurde auf 100 ml aufgefüllt.

M38 Bio-Rad DC Protein Assay (Fa. Biorad, München)**M39 Lämmli-Puffer (Fa. Biorad, München)****M40 SDS-Page (Ansatz für 1 l):**

3,03 g TRIS
14,4 g Glycin
10 g SDS

Die Substanzen wurden eingewogen und durch Rühren in Wasser gelöst. Das Volumen wurde auf 1 l aufgefüllt.

M41 15%iges Trenngel (Ansatz für 1 Gel, 8,3 cm x 8,3 cm x 0,75 mm)

1,8 ml Acrylamid (M73)
1,56 ml TRIS/HCl, pH 8,8 , der Konzentration 1 mol/l
1,2 ml Wasser
48 µl 10%ige SDS-Lösung
12 µl TEMED
48 µl 10%ige APS-Lösung

M42 5%iges Deckgel (Ansatz für 1 Gel)

225 μ l Acrylamid (M73)
500 μ l TRIS/HCl, pH 6,8 , der Konzentration 0,5 mol/l
1,25 ml Wasser
20 μ l 10%ige SDS-Lösung
5 μ l TEMED
12,5 μ l 10%ige APS-Lösung

M43 3MM-Papier (Fa. Merck, Frankfurt a.M.)

M44 Transferpuffer (Ansatz für 200 ml):

5,81 g TRIS
2,93 g Glycin
3,75 ml 10%ige SDS-Lösung

Die Substanzen wurden eingewogen und durch Rühren in Methanol gelöst. Das Volumen wurde auf 200 ml aufgefüllt.

M45 Nitrocellulose-Membran: Hybond ECL (Fa. Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg)

M46 Ponceaulösung (Ansatz für 1 l):

2,5 g Ponceau
400 ml Methanol
150 ml 10%ige Essigsäure
450 ml Wasser

M47 TBST (TRIS Buffered Solution with Tween) (Ansatz für 1 l):

10 ml TRIS-Lösung der Konzentration 1 mol/l, pH 7,4
30 ml NaCl-Lösung der Konzentration 5 mol/l
1 ml Tween 20 (M67)

Die Substanzen wurden eingewogen und durch Rühren in Wasser gelöst. Das Volumen wurde auf 1 l aufgefüllt

M48 Rabbit-anti-human VEGF (Fa. TEBU, Frankfurt am Main)

M49 Biotin-SP-konjugierter affinitätsgereinigter anti-rabbit-IgG (Fa. R&D Systems, Wiesbaden)

M50 TBS (TRIS Buffered Solution) (Ansatz für 1 l):

10 ml TRIS-Lösung der Konzentration 1 mol/l, pH 7,4
30 ml NaCl-Lösung der Konzentration 5 mol/l

Die Substanzen wurden eingewogen und durch Rühren in Wasser gelöst. Das Volumen wurde auf 1 l aufgefüllt.

M51 StreptABComplex/HRP (Fa. Dako, Hamburg)

M52 ECL-Detektionsreagenzien (Fa. Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg)

M53 Verpackungsfolie (Fa. Roth, Karlsruhe)

M54 Film (für Western Blot): Hyperfilm ECL (Fa. Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg)

M55 Human VEGF (Cytelisa) (Fa. AMS GmbH, Wiesbaden)

M56 Röntgenkassette (Fa. Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg)

M57 MOPS-Lösung, Konzentrationsfaktor 10 (Ansatz für 1 l):

41,8 g MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure)

4,1 g Natriumacetat

3,72 g Natrium-EDTA

Die Substanzen wurden eingewogen und durch Rühren in Wasser gelöst. Das Volumen wurde auf 1 l aufgefüllt und der pH auf 7 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

M58 Probenauftragspuffer

12,5 µl Probenpuffer (M59)

2,5 µl Wasser

1,0 µl Ethidiumbromid-Lösung der Konzentration 1 mg/ml

M59 Probenpuffer

7,5 ml deionisiertes Formamid

1,5 ml MOPS-Lösung, Konzentrationsfaktor 10

2,4 ml Formaldehyd-Lösung, 37%ig

1,0 ml Wasser

1,0 ml Glycerol-Lösung (autoklaviert)

0,8 ml Bromphenolblau-Lösung, 10%ig

M60 SSC-Lösung, Konzentrationsfaktor 20 (Ansatz für 4 l):

701,2 g NaCl

352,8 g Trinatriumcitratdihydrat

Die Substanzen wurden eingewogen und durch Rühren in Wasser gelöst. Das Volumen wurde auf 4 l aufgefüllt und der pH auf 7 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

SSC-Lösungen anderer Konzentrationen wurden aus dieser Lösung durch Verdünnen mit Wasser hergestellt.

M61 Nylonmembran: Duralon-UV-Membran (Fa. Stratagene Cloning Systems, Heidelberg)

M62 Hybridisierungspuffer (Ansatz für 10 ml):

5 ml Formamid
2 ml 50%ige Dextran-Lösung
0,5 ml 10%ige SDS-Lösung
2 ml NaCl-Lösung, Konzentration 5 mol/l
0,5 ml Wasser
200 µl Lachssperma-DNA

Die Lachssperma-DNA wurde vor Gebrauch 10 min bei 95°C denaturiert.

M63 RediPrime-DNA-labelling System (Fa. Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg)

M64 VEGF cDNA-Insert: freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. H. Weich, Braunschweig

M65 [³²P]dCTP (Fa. Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg)

M66 Röntgenfilm (für Northern Blot): X-Omat AR, Kodak Scientific Imaging Film (Fa. Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg)

M67 Tween20 (Fa. Biorad, München)

M68 T25-Kulturflaschen (Fa. Nunc, Wiesbaden)

M69 Rainbow coloured protein molecular weight marker (low molecular weight range) (Fa. Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg)

M70 Objektträger (Fa. Nunc, Wiesbaden)

M71 96-Well-Mikrotiterplatten (Fa. Nunc, Wiesbaden)

M72 96-Well-Platten (Fa. Greiner, Nürtingen)

M73 Acrylamid (Fa. Roth, Karlsruhe)

2. Abkürzungsverzeichnis

[³² P]-dCTP	mit ³² P markiertes Desoxycytidintriphosphat
[³ H]-Inulin	Tritium-markiertes Inulin
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMEC	brain microvascular endothelial cells; mikrovaskuläre Gehirnendothelzellen
BSA	Rinderserumalbumin
cpm	counts per minute; Zerfälle pro Minute
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBA	Evans blue Albumin
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FCS	fetales Kälberserum
GFAP	glial-fibrillary-acidic-protein
KRB	Krebs-Ringer-Puffer
LDL	low density lipoprotein
MAC	minimale alveoläre Konzentration, s. Kapitel II.1.3.
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumlaurylsulfat
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
TBS	TRIS Buffered Solution
TBST	TRIS Buffered Solution with Tween
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
VEGF	vascular endothelial growth factor
vWF	von-Willebrand-Faktor

VII. Zusammenfassung

Pathologische Bedingungen wie cerebrale Hypoxie können zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) führen. Durch Austritt von Plasma-proteinen, Wasser und Elektrolyten aus cerebralen Kapillaren ins Hirngewebe entsteht dann ein vasogenes Ödem, das zusätzlichen Schaden verursacht. Die als intravenöse Anästhetika eingesetzten Barbiturate Thiopental und Methohexital führen *in vivo* zu einer Reduktion des vasogenen Ödems. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass beide Pharmaka die Permeabilität unseres *in vitro* Modells der BHS unter normoxischen Bedingungen *nicht* veränderten, jedoch eine durch Hypoxie induzierte Hyperpermeabilität dosisabhängig reduzierten.

Bislang ist nur wenig über den Einfluss volatiler Anästhetika auf Funktionen der BHS bekannt. In dieser Arbeit wurde daher die Wirkung der im klinischen Bereich weit verbreiteten volatilen Anästhetika Halothan, Enfluran, Isofluran, Sevofluran und Desfluran auf die Permeabilität der *in vitro* BHS untersucht. Mikrovaskuläre Gehirndothelzellen vom Schwein wurden auf kollagenbeschichtete Filtermembranen ausgesät und bis zur Bildung eines konfluenten Monolayers kultiviert. Dann wurden die Zellen 6 h unter normoxischen Bedingungen (21 Vol.-% Sauerstoff) in Gegenwart eines der volatilen Anästhetika (Konzentration 4 MAC) inkubiert. Die Permeabilität wurde durch Messung der Passage von Evans blue Albumin und Tritium-markiertem Inulin über den Endothelzellmonolayer bestimmt. Es wurde gezeigt, dass unter normoxischen Bedingungen keines der volatilen Anästhetika die Permeabilität der *in vitro* BHS veränderte. Aufgrund der oben erwähnten Reduktion der Hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität der BHS durch Barbiturate wurde weiterhin der Einfluss volatiler Anästhetika auf die Permeabilität der *in vitro* BHS unter *hypoxischen* Bedingungen untersucht. Unter Hypoxie (2 Vol.-% Sauerstoff) kam es zu einer signifikanten Permeabilitätssteigerung, die jedoch durch die Gegenwart keines der volatilen Anästhetika (Konzentration 4 MAC) beeinflusst wurde. Weitere Untersuchungen zeigten, dass es zu keiner Veränderung der Vitalität, Morphologie und Gesamtproteinkonzentration der mikrovaskulären Endothelzellen nach 6-stündiger Inkubation unter Normoxie oder Hypoxie in Gegenwart der volatilen Anästhetika kam.

Es ist bekannt, dass die Hypoxie-induzierte Hyperpermeabilität des eingesetzten *in vitro* Modells durch Steigerung der autokrinen Expression des vascular endothelial growth factor (VEGF) vermittelt wird. Auch die permeabilitätsreduzierende Wirkung der Barbiturate Methohexital und Thiopental unter Hypoxie konnte auf die Reduktion der Expression von VEGF zurückgeführt werden. Zur Bestätigung der Ergebnisse der Permeabilitätsstudien wurde daher die VEGF-Expression in mikrovaskulären

Gehirnendothelzellen unter dem Einfluss volatiler Anästhetika untersucht. Es stellte sich heraus, dass keines der volatilen Anästhetika die VEGF-Expression unter normoxischen Bedingungen quantitativ veränderte. Unter Hypoxie kam es zu einer signifikanten Steigerung der quantitativen VEGF-Expression, die jedoch durch die Gegenwart keines der volatilen Anästhetika beeinflusst wurde.

Astrozyten stehen *in vivo* strukturell und funktionell in enger Wechselwirkung mit den mikrovaskulären Endothelzellen und induzieren durch die Sekretion bislang unbekannter Faktoren viele der spezifischen Eigenschaften der BHS. Daher wurde untersucht, ob volatile Anästhetika einen schädigenden Einfluss auf Astrozyten haben und somit indirekt die Permeabilität der BHS beeinflussen könnten. Es wurde gezeigt, dass unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen die 6-stündige Einwirkung *keines* der volatilen Anästhetika die Vitalität von Astrozyten neonataler Ratten beeinträchtigte.

Schlussfolgerung: Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass die volatilen Anästhetika Halothan, Enfluran, Isofluran, Sevofluran und Desfluran keinen Einfluss auf Permeabilitätseigenschaften von mikrovaskulären Gehirnendothelzellen haben, die *in vivo* die BHS bilden.

VIII. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schaper danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, seine wertvollen Ratschläge sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Außerdem dafür, dass ich Gelegenheit erhielt, die Arbeit auf einem internationalen Kongress vorzustellen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Silvia Fischer für ihre Betreuung. Sie war stets hilfsbereit und hat mich in viele der Arbeitstechniken eingearbeitet. Sie ist der Kopf der Arbeitsgruppe, hat das Permeabilitätsmodell maßgeblich entwickelt und weckte meine Begeisterung für die Blut-Hirn-Schranke.

Frau Marion Wiesnet möchte ich für die Einweisung in die Laborarbeit, die vielen Tipps und Tricks und die ständige Offenheit für Fragen danken.

Den Feinmechanikern Herrn Siegfried Langsdorf und Herrn Christof Bingel danke ich für die Konstruktion des hervorragenden Kammersystems zur Inkubation der Zellen sowie für die Unterstützung in allen technischen Belangen.

Frau Petra Richter möchte ich für das Spülen der Laborgeräte und Entsorgen des Abfalls danken.

Herrn Gerhard Stämmeler danke ich für seine wertvolle Hilfe in der EDV.

Unterstützung erfuhr ich auch durch Herrn Dr. rer. nat. Dimitri Scholz, Frau cand. med. Maria Wobben und Frau cand. med. Anja Reinel. Ein Dank gilt ebenfalls allen weiteren Mitarbeitern des Instituts.

Herrn Dr. med. Dieter Renz, Kerckhoffklinik Bad Nauheim, danke ich für die großzügige Bereitstellung eines Perfusors und sämtlicher volatiler Anästhetika.

Nathalie danke ich für ihre emotionale Unterstützung und das Verständnis für den hohen Arbeitsaufwand dieser Arbeit.

Meinen Eltern möchte ich für ihre in jeder Hinsicht einmalige Unterstützung während des gesamten Studiums und der Promotion danken.

IX. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jan Andreas Kleinstück
Geburtsdatum: 22.10.1974
Geburtsort: Köln

Schulbildung und Ersatzdienst

1981-1982	Grundschule Flittard, Köln
1982-1985	Gemeinschaftsgrundschule Katterbach, Bergisch Gladbach
1985-1994	Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium, Bergisch Gladbach
17.06.1994	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
7/1994-9/1995	Ersatzdienst beim Arbeiter-Samariter-Bund, Bergisch Gladbach

Universitäre Ausbildung und Prüfungen

13.09.1995	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität, Gießen
09.09.1997	Ärztliche Vorprüfung
27.08.1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/1998-3/1999	Auslandssemester an der Universidad de Granada, Spanien
12.09.2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
21.10.2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion

1999-2003	Ausarbeitung einer Dissertation am Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung, Kerckhoff Institut, Abteilung Experimentelle Kardiologie, Leiter: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Schaper, Benekestrasse 2, 61231 Bad Nauheim
-----------	--

Veröffentlichungen

Fischer S, Wobben M, Kleinstück J, Renz D, Schaper W. Effect of astroglial cells on hypoxia-induced permeability in PBMEC cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C935-944, 2000

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.